

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK JINTEN HITAM
DALAM MENCEGAH STRES OKSIDATIF
AKIBAT LATIHAN OLAAHRAGA ANAEROBIK
PADA TIKUS PUTIH**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



HAIRRUDIN

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2005



TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK JINTEN HITAM
DALAM MENCEGAH STRES OKSIDATIF
AKIBAT LATIHAN OLAAHRAGA ANAEROBIK
PADA TIKUS PUTIH**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

HAIRRUDIN

090314993 M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK JINTEN HITAM
DALAM MENCEGAH STRES OKSIDATIF
AKIBAT LATIHAN OLAH RAGA ANAEROBIK
PADA TIKUS PUTIH**

TESIS

Untuk memperoleh gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh :
Hairrudin
090314993M

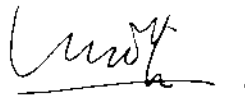
**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
16 AGUSTUS 2005**

LEMBAR PENGESAHAN

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL, 16 Agustus 2005

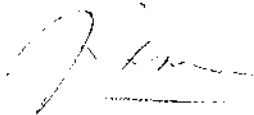
Oleh

Pembimbing Ketua



Prof. Dr. Indri Safitri, dr, MS
NIP 130 933 211

Pembimbing



V. Pikanto Wibowo, dr, SpBK
NIP 130 345 877

Telah diuji pada

Tanggal: 16 Agustus 2005

PANITIA PENGUJI TESIS

PANITIA PENGUJI

Ketua : Dr. Harjanto JM, dr, AIF

Anggota : 1. Prof. Dr. Indri Safitri, dr, MS
2. V. Pikanto Wibowo, dr, SpBK
3. Juniadi Soetowo, dr, SpBK
4. Dr. Arief Wibowo, dr, MS

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat, karunia dan petunjuk-Nya yang telah dilimpahkan kepada penulis, sehingga mampu menyelesaikan penelitian/tesis ini. Penelitian ini tidak akan selesai tanpa bantuan dan bimbingan berbagai pihak, sehingga sudah selayaknya penulis dengan tulus ingin menyampaikan rasa terimakasih yang sedalam-dalamnya.

Dengan segala ketulusan hati penulis sampaikan terimakasih yang tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya kepada Prof. Dr. Indri Safitri, dr, MS selaku pembimbing ketua sekaligus Ketua Minat Studi Ilmu Biokimia Program Pascasarjana Universitas Airlangga dan V. Pikanto W, dr, SpBK selaku pembimbing atas semua jerih payah beliau dalam membimbing, memberikan masukan-masukan, bekal pengetahuan serta dorongan semangat yang tiada henti-hentinya sejak usulan penelitian, persiapan penelitian hingga selesainya penulisan tesis ini.

Ucapan terimakasih yang sedalam-dalamnya penulis sampaikan juga kepada Dr. Harjanto JM, dr, AIF yang telah banyak memberikan masukan dan pinjaman kepustakaan yang sangat berguna dan kepada Dr. Arief W, dr, MS yang membantu dalam bidang statistik.

Menyadari bahwa tesis ini tidak mungkin terwujud tanpa bantuan dan peran serta berbagai pihak maka perkenankan penulis dengan setulus hati mengucapkan terimakasih kepada yth :

Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Med Puruhito, SpBTKV ; Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. H. Muhammad Amin; Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Program Pascasarjana Universitas Airlangga,

Prof. Dr. Retno Handayani, dr, MS; Kepala Laboratorium Ilmu Biokimia, Prof. Soetjipto, dr, MS, PhD atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Rektor Universitas Jember dan Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Universitas Jember yang telah menugaskan penulis untuk belajar di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Kepala Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya beserta seluruh staf yang telah memberikan ijin dan bantuan kepada penulis untuk menggunakan sarana serta fasilitas laboratoriumnya selama penulis melakukan penelitian.

Kepada dia yang selalu saya sayangi, istri tercinta Khairunnisa, ST, M.MT dan ananda tersayang Naurah Nazihah Azzalina, serta seluruh anggota keluarga di Jember dan Lumajang yang telah banyak berkorban, memberikan dorongan, doa restu sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Teman-temanku tersayang Siti Khotimah, dr dan Syamsulina Revianti, drg yang selalu memberikan masukan, kritikan, segala macam bantuan kepada penulis selama proses pembuatan tesis ini.

Akhirnya penulis menyadari bahwa hasil penulisan tesis ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu saran dan masukan yang berharga sangat penulis harapkan, agar nantinya tulisan ini dapat bermanfaat bagi upaya pengembangan kesehatan di Indonesia. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada kita semua.

Surabaya, Agustus 2005

RINGKASAN

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK JINTEN HITAM DALAM MENCEGAH STRES OKSIDATIF AKIBAT LATIHAN OLAHRAGA ANAEROBIK PADA TIKUS PUTIH

Thymoquinon sebagai bahan aktif utama pada jinten hitam diketahui mempunyai aktivitas antioksidan. Bahan aktif lain pada jinten hitam seperti karbakol, t-anethol, 4 terpinol juga diduga mempunyai aktivitas antioksidan sehingga ekstrak jinten hitam kemungkinan dapat digunakan sebagai antioksidan yang potent.

Peningkatan oksidan di dalam tubuh yang melebihi kemampuan tubuh untuk menetralisirnya menimbulkan stres oksidatif yang ditandai dengan peningkatan kadar MDA plasma dan aktivitas SOD eritrosit. Salah satu keadaan yang dapat meningkatkan oksidan dalam tubuh adalah latihan olahraga anaerobik. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh pemberian ekstrak jinten hitam dalam mencegah stres oksidatif pada tikus putih yang diberi perlakuan latihan olahraga anaerobik berupa renang.

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *The Post Test Only Control Group Design*. Hewan coba yang dipakai adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan, 30 ekor, umur 3 bulan yang dibagi secara acak menjadi 5 kelompok. Kelompok pertama (K0) sebagai kelompok kontrol, kelompok kedua (K1) mendapat perlakuan latihan olahraga anaerobik, kelompok ketiga (K2), keempat (K3) dan kelima (K4) diberikan ekstrak jinten hitam dengan dosis masing-masing 1, 2, dan 4 ml/kgBB/h, per sonde selama 5 hari. Satu jam setelah pemberian terakhir dilakukan

latihan olahraga anaerobik berupa latihan renang dengan menggunakan beban seberat 9% berat badan tikus dan diikatkan 5 cm dari ujung ekor tikus. Lamanya waktu berenang adalah 80% dari waktu berenang maksimal yang ditentukan melalui penelitian pendahuluan.

Satu jam setelahnya dilakukan pemeriksaan kadar MDA plasma dan aktivitas SOD eritrosit. Sampel darah diambil dari ventrikel tikus setelah sebelumnya dianestesi dengan eter. Kadar MDA plasma ditentukan dengan metode TBARS dari Flower, sedangkan aktivitas SOD eritrosit ditentukan dengan metode Wong.

Data penelitian diajukan secara deskriptif dan dianalisis menggunakan MANOVA dan LSD. Hasil penelitian membuktikan bahwa latihan olahraga anaerobik (K1) menaikkan kadar MDA plasma (1.057 ± 0.28) dan menurunkan aktivitas SOD eritrosit (0.0567 ± 0.01) dibandingkan dengan kontrol (0.5155 ± 0.1) dan (0.1030 ± 0.01). Pemberian ekstrak jinten hitam sebelum latihan olahraga anaerobik ternyata dapat mencegah terjadinya stress oksidatif yang ditandai dengan menurunnya kadar MDA plasma pada K2 (0.9090 ± 0.25), K3 (0.7467 ± 0.07) dan K4 (0.4717 ± 0.17) dibandingkan dengan K1, serta peningkatan aktivitas SOD eritrosit pada K2 (0.0639 ± 0.01), K3 (0.0743 ± 0.01) dan K4 (0.0956 ± 0.01).

Pada uji MANOVA didapatkan perbedaan yang bermakna ($p=0.00$). Dari uji LSD diketahui bahwa kadar MDA plasma K0 berbeda bermakna dengan K1 ($p=0.00$) dan K2 ($p=0.004$), tetapi tidak bermakna dengan K3 ($p=0.086$) dan K4 ($p=0.737$). K1 berbeda bermakna dengan K3 ($p=0.020$) dan K4 ($p=0.00$) tetapi berbeda tidak bermakna dengan K2 ($p=0.221$). Aktivitas SOD eritrosit K0 berbeda bermakna dengan K1 ($p=0.00$), K2 ($p=0.00$) dan K3 ($p=0.02$) tetapi berbeda tidak bermakna

dengan K4 ($p=0.367$), sedangkan K1 berbeda bermakna dengan K4 ($p=0.00$) tetapi berbeda tidak bermakna dengan K2 ($p=0.336$) dan K3 ($p=0.118$).

Penelitian ini menghasilkan suatu kesimpulan bahwa ekstrak jinten hitam dapat mencegah stres oksidatif akibat latihan olahraga anaerobik pada tikus putih.

SUMMARY
THE INFLUENCE OF EXTRACT NIGELLA SATIVA
ON THE PREVENTION OF OXIDATIVE STRESS
OF RATTUS NORVEGICUS
WHICH WAS GIVEN ANAEROBIC PHYSICAL EXERCISE

As major active component of *N. sativa*, thymoquinone has been known to have antioxidant activity. The other active components such as carvacrol, t-anethol, 4 terpinol also were proposed have antioxidant activity. Further more, *N. sativa* was proposed potentially have antioxidant activity.

The oxidant's increase in body which over than body, capacity to netralize can impact oxidative stress, which was indicated by the increase of MDA plasma level and erythrocyte SOD activity. One of condition can improve the oxidant in body was an aerobic exercise. This study focused on the effect of oral administration of extract *N. sativa* to prevent oxidative stress of *R. norvegicus*, which was given physical activity (swimming).

The experimental design used *The Post Test Only Control Group Design*. The subjects were 30 male *R. norvegicus* strain wistar. Their old were 3 months. They were devided into 5 groups. The first group (K0) as the control. The second group (K1) was given anaerobic physical exercise. The third (K2), the fourth (K3) and the fifth (K4) were given oral extract *N. sativa* with each doses 1, 2 and 4 ml/kg body weight for 5 days. One hour after the last administration, the groups were given anaerobic physical activitiy, swimming by using the load as much as 9% of body

weight and was bundled along 5 cm in rat's tail. The duration to swim was 80% of the maximum time duration was determined through per experimental study.

One hour after that, plasma MDA and erythrocyte SOD activity of each group were measured. Blood sample was took from rat's ventrikel. The plasma MDA level was determined by TBARS methode of Flower and erythrocyte SOD activity was determined by Wong's methode.

The data was descriptive and analyzed using MANOVA and LSD. The result provided evidences that anaerobic exercise of K1 could increase plasma MDA level (1.0570 ± 0.28) and decrease SOD erythrocyte activity (0.0567 ± 0.01) more than the control (0.5155 ± 0.1 and 0.1030 ± 0.01). The administration of *N. sativa* before anaerobic exercise could prevent oxidative stress which was indicated by decrease of plasma MDA level in K2 (0.9090 ± 0.25), K3 (0.7467 ± 0.17) and K4 (0.4717 ± 0.17) than K1 and increase erythrocyte SOD activity in K2 (0.0639 ± 0.01), K3 (0.0743 ± 0.01) and K4 (0.0956 ± 0.01).

The MANOVA test showed a significant difference ($p=0.00$). The LSD test showed that plasma MDA level K0 had significant difference with K1 ($p=0.00$) and K2 ($p=0.004$), but no significant difference with K3 ($p=0.86$) and K4 ($p=0.737$). K1 had no significant difference with K3 ($p=0.020$) and K4 ($p=0.00$), but no significant difference with K2 ($p=0.221$). Erythrocytes SOD activity K0 had significant difference with K1 ($p=0.00$), K2 ($p=0.00$) and K3 ($p=0.002$), but no significant difference with K4 ($p=0.367$).

However, K1 had significant difference with K4 ($p=0.00$) but no significant difference with K2 ($p=0.336$) and K3 ($p=0.118$).

Finally, the study provided conclusion that *N. sativa* extract could prevent oxidative stress of *R. norvegicus* which was given anaerobic physical exercise.

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Persetujuan	iii
Penetapan Panitia Penguji	iv
Pengesahan	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
ABSTRACT	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 Tinjauan Pustaka	7
2.1 Oksidan dan Radikal Bebas	7
2.2 <i>Reactive oxygen species</i> (ROS)	9
2.2.1 Pembentukan ROS	10
2.2.1.1 Ion superoksida	10
2.2.1.2 Hidrogen peroksida.....	11
2.2.1.3 Singlet oksigen	12
2.2.1.4 Radikal hidroksil	13
2.2.1.5 Radikal nitrik oksida	13
2.2.1.6 Radikal nitrogen dioksida	13
2.2.1.7 Radikal alkoksil	14
2.2.2 Dampak negatif ROS	14
2.2.2.1 Dampak negatif terhadap asam lemak	15
2.2.2.2 Dampak negatif terhadap DNA	16
2.2.2.3 Dampak negatif terhadap protein	17
2.2.3 Dampak Positif Oksidan	18
2.2.4 MDA	18
2.3 Anti Oksidan	19
2.3.1 Klasifikasi Antioksidan	20
2.3.2 Peranan SOD sebagai antioksidan	23
2.3.3 Sistem antioksidan eritrosit	24

2.4	Latihan Olahraga Anaerobik	24
2.4.1	Hubungan latihan dan peningkatan produksi ROS	26
2.4.2	Peranan santin oksidase dalam pembentukan ROS	26
2.4.3	Asam laktat merubah ion superoksida menjadi lebih reaktif..	28
2.4.4	Katekolamin meningkatkan produksi ROS	29
2.5	Jinten Hitam	30
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	35
3.1	Kerangka Konseptual	35
3.2	Hipotesis Penelitian	38
BAB 4	METODE PENELITIAN	39
4.1	Jenis dan Rancangan Penelitian	39
4.2	Sampel, Besar Sampel dan Tehnik Pengambilan Sampel	40
4.3	Variabel Penelitian	41
4.3.1	Klasifikasi variabel	41
4.3.2	Definisi operasional variabel	41
4.4	Bahan Penelitian	43
4.4.1	Hewan coba	43
4.4.2	Ekstrak jinten hitam	43
4.4.3	Darah	43
4.5	Instrumen Penelitian	43
4.6	Prosedur Penelitian	44
4.6.1	Persiapan hewan coba	44
4.6.2	Pembagian kelompok hewan coba	44
4.6.3	Pemberian ekstrak jinten hitam	45
4.6.4	Latihan olahraga anaerobik	45
4.6.5	Prosedur pengambilan darah	46
4.6.5.1	Kadar MDA plasma	46
4.6.5.2	Aktivitas SOD eritrosit	46
4.6.5.3	Jumlah eritrosit	47
4.6.5.4	PCV	47
4.7	Lokasi dan Jadwal Penelitian	47
4.7.1	Lokasi penelitian	47
4.7.2	Jadwal penelitian	48
4.8	Analisis Data	48
4.9	Kerangka Operasional	49
BAB 5	ANALISIS HASIL PENELITIAN	50
5.1	Hasil Uji Statistik deskriptif	50
5.2	Hasil Uji Normalitas	51
5.3	Homogenitas	52
5.4	Hasil Uji MANOVA	52
5.5	Hasil Uji ANOVA	53
5.5	Hasil Uji LSD	54

BAB 6 PEMBAHASAN	57
6.1 Pembahasan Metode	57
6.2 Pembahasan Hasil Penelitian	59
6.2.1 Uji statistik deskriptif	60
6.2.2 Uji normalitas	60
6.2.3 Uji homogenitas	61
6.2.4 Uji MANOVA dan LSD	61
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	65
7.1 Kesimpulan	65
7.2 Saran	65
DAFTAR PUSTAKA	66
LAMPIRAN	72

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Intensitas Latihan	25
Tabel 2.2 Komposisi Bahan yang Dikandung Dalam Jinten Hitam	33
Tabel 5.1 Rata-rata Kadar MDA plasma dan Aktivitas SOD eritrosit	51
Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas	52
Tabel 5.3 Hasil Uji Homogenitas	52
Tabel 5.4 Hasil Uji MANOVA	52
Tabel 5.5 Hasil Uji ANOVA	53
Tabel 5.6 Hasil Uji LSD	54

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Pembentukan dan Hubungan Antar ROS	15
Gambar 2.2 Peranan XO dalam Meningkatkan ROS	28
Gambar 2.3 Pohon dan Bunga Jinten Hitam	31
Gambar 2.4 Biji Jinten Hitam	31

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Penentuan Besar Sampel	72
Lampiran 2 Prosedur Pembuatan Ekstrak Jinten Hitam	73
Lampiran 3 Prosedur Pengukuran Kadar MDA Plasma	74
Lampiran 4 Prosedur Pengukuran SOD eritrosit	75
Lampiran 5 Hasil Penentuan Kemampuan Renang Maksimal	76
Lampiran 6 Hasil Pemeriksaan Kadar MDA Plasma, Aktivitas SOD Eritrosit dan PCV	79
Lampiran 7 Hasil Uji Statistik	80
Foto Dokumentasi	86

DAFTAR SINGKATAN

ADP	: adenosin difosfat
AMP	: adenosin monofosfat
ALT	: alanin transaminase
AST	: aspartat transaminase
ATP	: adenosin trifosfat
ATP-PC	: adenosin trifosfat fosfo kreatin
CCL ₄	: tetra klorida
CLO ⁻	: hipoklorida
Cys-SH	: sistein
DNA	: <i>deoxyribonucleic acid</i>
DHAA	: <i>dihidro ascorbic acid</i>
GSH	: glutation
GST	: glutation-S transferase
H ₂ O ₂	: hidrogen peroksida
Hb	: hemoglobin
LOO•	: radikal peroksilipid
MANOVA	: <i>multiple analysis of variance</i>
MDA	: malondialdehyde
ug/ml	: mikrogram per milliliter
uU/eri	: mikrounit per eritrosit
NBT	: <i>nitro blue toluen</i>
NOS	: <i>nitric oxyde synthase</i>
P	: perlakuan
PCV	: <i>packed cell volume</i>
PGH ₂	: prostaglandin
PUFA	: <i>poly unsaturated fatty acid</i>
R	: random
ROS	: <i>reactive oxygen species</i>
S	: sampel
SOD	: superoxide dismutase
SH	: sulfhidril
O ₂	: oksigen
•O ₂ ⁻	: ion superoksida
¹ O ₂	: singlet oksigen
•OOH	: radikal peroksil
ONOO ⁻	: peroksinitrit
TBARS	: <i>thiobarbituric acid reactive substance</i>
TBHP	: <i>tert-buthyl hidroperoksida</i>
XD	: santin dehidrogenase
XO	: santin oksidase

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Harga obat-obatan modern yang relatif mahal (termasuk antioksidan), menuntut pencarian obat alternatif yang relatif lebih murah. Saat ini sedang digalakkan mencari obat alternatif dari bahan alami (obat tradisional), terutama yang berasal dari tanaman. Dunia tanaman masih merupakan lahan penelitian yang sangat luas, untuk mendapatkan bahan obat baru atau molekul obat baru. Baru sekitar 10% dari 250.000 spesies tanaman yang diduga mengandung obat, dimanfaatkan untuk pengobatan (Wagner & Jurcic, 1991; Isnandar, 2003).

Salah satu obat tradisional yang menarik banyak peneliti saat ini adalah jinten hitam (*Nigella sativa*). Jinten hitam mengandung lebih dari seratus bahan nutrisi berharga. Bagian yang sering digunakan untuk pengobatan adalah bijinya. Kandungan aktif biji jinten hitam diantaranya thymoquinon dan nigellon (Daba & Abdel Rahman, 1998).

Sebagai obat tradisional jinten hitam digunakan untuk menjaga kesehatan dan mengatasi beberapa penyakit seperti asma, influenza, rematik, penurunan panas serta untuk mengatasi infeksi bakteri dan parasit (El-Kadi & Kandil, 1986; Al-Jishi, 2000). Beberapa penelitian terakhir membuktikan bahwa thymoquinon mempunyai efek antioksidan (El-Daly, 1998; Daba & Abdel Rahman, 1998). Bahan aktif lain pada jinten hitam seperti karbakrol, t-anethol, dan 4-terpineol diduga juga mempunyai kemampuan *radical scavenging* yang efektif pada peroksidasi lipid

(Burits & Bucar, 2000), sehingga kemungkinan ekstrak jinten hitam dapat digunakan sebagai antioksidan yang efektif.

Antioksidan adalah senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan. Oksidan sendiri merupakan senyawa penerima elektron yaitu senyawa yang dapat menarik elektron. Oksidan perlu dibedakan dengan radikal bebas, radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki elektron yang tidak berpasangan (*unpaired elektron*) pada orbit/lintasan luarnya, sehingga cenderung menarik elektron dari luar. Pada umumnya radikal bebas termasuk oksidan tetapi tidak semua oksidan merupakan radikal bebas. Radikal bebas mempunyai sifat reaktifitas yang tinggi dan dapat merubah suatu molekul menjadi suatu radikal yang baru, sehingga dapat menimbulkan reaksi rantai (*chain reaction*) (Suryohudoyo, 2000).

Oksidan dapat berasal dari luar (eksogen) maupun dari dalam tubuh sendiri (endogen). Oksidan yang berasal dari dalam tubuh melibatkan apa yang disebut *reactive oxygen compound* atau *reactive oxygen species* (ROS), meliputi hidrogen peroksida (H_2O_2), ion superoksida ($\bullet O_2^-$), radikal peroksil ($\bullet OOH$), radikal hidroksil ($\bullet OH$) dan singlet oksigen (1O_2). Radikal hidroksil merupakan anggota ROS yang paling berbahaya karena reaktifitasnya yang sangat tinggi (Leuwenburgh & Heinecke, 2001). Sebagai contoh radikal hidroksil dapat merusak asam lemak, khususnya asam lemak tak jenuh yang merupakan komponen penting penyusun membran sel. Radikal hidroksil dapat menimbulkan reaksi rantai yang dikenal dengan peroksidasi lipid (*lipid peroxidation*). Proses tersebut mengakibatkan terputusnya asam lemak menjadi berbagai senyawa yang toksik terhadap sel, seperti malondialdehid (MDA) dan 9-hidroksi nonenal (Sjodin, 1990; Cochrane, 1991).

MDA dapat dipakai sebagai indikator besarnya kerusakan membran sel akibat peroksidasi lipid (Pate' 1999). MDA yang dihasilkan akan dilepaskan ke plasma dan mencapai kadar maksimal setelah 6 jam pasca latihan (Clarkson, 1995; Harjanto, 2004), sehingga kadar MDA plasma dapat dijadikan sebagai petanda tidak langsung (*indirect indicator*) yang akurat adanya peristiwa peroksidasi lipid (Clarkson & Thompson, 2000).

Untuk meredam dan mencegah (dalam tubuh kita) terdapat senyawa antioksidan. Salah satu yang berperan enzim *superoxide dismutase* (SOD) yang mengkatalisis reaksi :



$\bullet\text{O}_2^-$ mempunyai pelepasan radikal yang oksidatif tetapi SOD dapat meredamnya. Aktivitas SOD dan resistensi terhadap serangan radikal sehingga peranan SOD sangat penting untuk meredam serangan ROS (Halliwell & Gutteridge, 1999). Peningkatan aktivitas SOD dalam tubuh untuk menetralkan radikal bebas disebut stres oksidatif (Halliwell & Gutteridge, 1999). Stres oksidatif dapat menyebabkan stres oksidatif. Pada latihan olahraga berat, produksi radikal bebas meningkat karena konsumsi oksigen (Ji, 2003) yang menyebabkan stres oksidatif.

Salah satu indikator besarnya kerusakan membran sel adalah kadar MDA. MDA yang dihasilkan akan dilepaskan ke plasma dan mencapai kadar maksimal setelah 6 jam pasca latihan (Clarkson, 1995; Harjanto, 2004), sehingga kadar MDA plasma dapat dijadikan sebagai petanda tidak langsung (*indirect indicator*) yang akurat adanya peristiwa peroksidasi lipid (Clarkson & Thompson, 2000).

Salah satu indikator besarnya kerusakan membran sel adalah kadar MDA. MDA yang dihasilkan akan dilepaskan ke plasma dan mencapai kadar maksimal setelah 6 jam pasca latihan (Clarkson, 1995; Harjanto, 2004), sehingga kadar MDA plasma dapat dijadikan sebagai petanda tidak langsung (*indirect indicator*) yang akurat adanya peristiwa peroksidasi lipid (Clarkson & Thompson, 2000).

Salah satu indikator besarnya kerusakan membran sel adalah kadar MDA. MDA yang dihasilkan akan dilepaskan ke plasma dan mencapai kadar maksimal setelah 6 jam pasca latihan (Clarkson, 1995; Harjanto, 2004), sehingga kadar MDA plasma dapat dijadikan sebagai petanda tidak langsung (*indirect indicator*) yang akurat adanya peristiwa peroksidasi lipid (Clarkson & Thompson, 2000).

Sebagai contoh latihan olahraga berat misalnya adalah latihan olahraga anaerobik (Bompa, 1994). Latihan olahraga anaerobik menggunakan sumber energi utama dari *alactic system* (ATP-PC) dan *lactic system* (Soekarman, 1989). Penyediaan energi melalui *lactic system* menghasilkan asam laktat yang dapat merubah ROS menjadi lebih reaktif (Demopaulus, 1994).

Salah satu sel yang sangat rentan terhadap oksidan adalah eritrosit. Stres oksidatif dapat menyebabkan kerusakan membran eritrosit, jika berat dapat menyebabkan anemia (Enturk *et al.*, 2001). Eritrosit merupakan sel tubuh yang sangat vital fungsinya. Kerusakan pada eritrosit dapat mengganggu fungsinya. Untuk melindungi eritrosit, di dalam eritrosit didapat antioksidan dengan kadar yang tinggi, meliputi SOD, glutathione dan glutathione peroksidase. Eritrosit dewasa tidak mempunyai inti sel, jika terjadi kerusakan pada antioksidan eritrosit ia tidak dapat mempertahankan kadar antioksidan tersebut dengan cara mensintesisnya (Aslan *et al.*, 1998).

Stres oksidatif pada latihan juga dapat mempengaruhi antioksidan endogen, termasuk SOD, sehingga aktivitasnya dapat menurun (Harjanto, 2004). Pada latihan olahraga anaerobik akan dihasilkan $\bullet\text{O}_2^-$ dalam jumlah yang sangat besar. $\bullet\text{O}_2^-$ merupakan oksidan yang penting. Disamping dapat membentuk oksidan yang lain seperti H_2O_2 , $\bullet\text{OOH}$ dan peroksinitrit (ONOO^-) (Halliwell & Gutteridge, 1999), $\bullet\text{O}_2^-$ dapat bereaksi dengan ion logam yang menghasilkan logam transisi yang berperan dalam pembentukan $\bullet\text{OH}$. $\bullet\text{O}_2^-$ juga dapat menghambat aktivitas beberapa enzim antioksidan seperti katalase dan glutathione peroksidase (Halliwell & Gutteridge, 1999; Harjanto, 2004), sehingga keberadaan SOD menjadi sangat penting dalam mencegah

stres oksidatif akibat latihan olahraga anaerobik (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001). Aktivitas SOD dapat dipakai sebagai indikator untuk mengetahui dinamika aktivitas enzim antioksidan dalam menetralkan aktivitas ROS yang terbentuk (Patellongi, 1999). SOD dapat dijadikan sebagai petanda yang baik adanya stres oksidatif (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001). Untuk menghindari kerusakan stres oksidatif akibat latihan olahraga diperlukan masukan antioksidan dari luar (Ji, 1999). Belum diketahui dengan jelas apakah ekstrak jinten hitam dapat digunakan untuk mencegah stres oksidatif akibat latihan olahraga anaerobik, sehingga diperlukan penelitian yang dapat menjelaskan masalah tersebut.

Untuk mempelajari efek antioksidan dari jinten hitam maka dilakukan penelitian ini. Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) karena mempunyai karakter biologis yang mirip dengan manusia. Tikus putih banyak digunakan pada penelitian tentang pengaruh latihan olahraga terhadap terjadinya stres oksidatif. Pada penelitian ini digunakan latihan olahraga renang, dengan pertimbangan lebih mudah dilakukan (Harjanto & Santoso, 2001).

1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang yang telah diuraikan diatas, permasalahan dalam penelitian ini dirumuskan sebagai berikut :

1. Apakah pemberian ekstrak jinten hitam dapat menghambat peningkatan kadar MDA plasma tikus putih yang mendapat perlakuan latihan olahraga anaerobik.
2. Apakah pemberian ekstrak jinten hitam dapat menghambat penurunan aktivitas SOD eritrosit tikus putih yang mendapat perlakuan latihan olahraga anaerobik.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mempelajari peranan ekstrak jinten hitam dalam mencegah stres oksidatif akibat latihan olahraga anaerobik pada tikus putih.

1.3.2 Tujuan khusus

Tujuan khusus pada penelitian ini adalah :

1. Membuktikan bahwa ekstrak jinten hitam dapat menghambat peningkatan kadar MDA plasma tikus putih yang mendapat perlakuan latihan olahraga anaerobik
2. Membuktikan bahwa ekstrak jinten hitam dapat menghambat penurunan aktivitas SOD eritrosit tikus putih yang mendapat perlakuan latihan olahraga anaerobik

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian dibidang akademis :

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bahwa ekstrak jinten hitam dapat menghambat peningkatan kadar MDA plasma tikus putih yang mendapat perlakuan latihan olahraga anaerobik.
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bahwa ekstrak jinten hitam dapat menghambat peningkatan kadar MDA plasma dan penurunan aktivitas SOD eritrosit tikus putih yang mendapat perlakuan latihan olahraga anaerobik.

Manfaat praktis :

Memberikan informasi tentang penggunaan jinten hitam sebagai antioksidan.

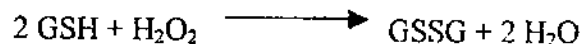
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Oksidan dan Radikal Bebas

Pengertian oksidan dan radikal bebas dibidang kedokteran sering dibaurkan karena keduanya memiliki sifat yang mirip. Aktifitas kedua senyawa ini sering menghasilkan akibat yang sama walaupun prosesnya berbeda (Suryohudoyo, 2000). Misalnya dampak oksidan H_2O_2 dan radikal bebas $\cdot\text{OH}$ terhadap GSH adalah sebagai berikut :

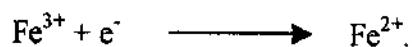
- H_2O_2



- $\cdot\text{OH}$



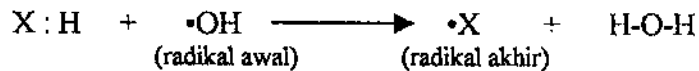
Di bidang ilmu kimia pengertian oksidan dan radikal bebas dibedakan. Oksidan adalah senyawa penerima elektron yaitu senyawa-senyawa yang dapat menarik elektron (Suryohudoyo, 2000 ; Wijaya, 1996). Sebagai contoh adalah Fe^{3+} pada reaksi :



Radikal bebas adalah atom/molekul (kumpulan atom) yang mempunyai elektron yang tidak berpasangan (*unpaired electron*) pada orbit/lintasan luarnya, misalnya $\cdot\text{OH}$ dan $\cdot\text{OOH}$. Elektron yang tidak berpasangan ini cenderung menarik

elektron dari senyawa lain. Akibatnya terbentuk radikal bebas yang baru dari senyawa lain tersebut (Wijaya, 1996).

Sebagai contoh adalah reaksi dibawah ini :



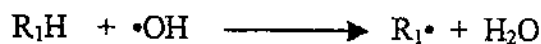
Jadi oksidan dan radikal bebas keduanya dapat menarik elektron. Pada umumnya radikal bebas termasuk oksidan karena dapat menarik elektron, tetapi tidak setiap oksidan merupakan radikal bebas (ada oksidan yang tidak memiliki elektron tidak berpasangan) (Lautan, 1997; Suryohudoyo, 2005).

Radikal bebas lebih berbahaya dari oksidan nonradikal. Hal ini karena radikal bebas mempunyai dua sifat yaitu :

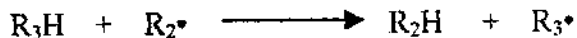
1. reaktifitas yang tinggi, karena kecenderungannya menarik elektron
2. dapat merubah senyawa nonradikal menjadi radikal (Cochrane, 1991; Lautan, 1997).

Kemampuan radikal bebas merubah senyawa nonradikal menjadi radikal memicu terjadinya reaksi rantai (*chain reaction*), yang baru berhenti jika radikal bebas yang terbentuk dapat diredam. Seluruh reaksi rantai yang dipicu oleh radikal bebas dapat dibagi menjadi tiga tahap yaitu :

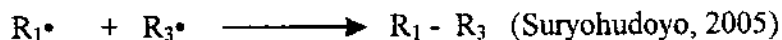
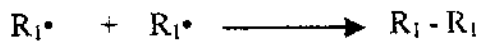
1. tahap inisiasi



2. tahap propagasi



3. tahap terminasi



2.2 Reactive Oxygen Species (ROS)

Oksidan dapat berasal dari luar (eksogen) ataupun dari dalam tubuh sendiri (endogen). Oksidan yang terlibat dalam berbagai proses biologis sebagian besar justru berasal dari proses biologis alami yang melibatkan *reactive oxygen species* (ROS). ROS merupakan senyawa-senyawa reaktif yang berasal dari O_2 , senyawa yang diperlukan oleh semua organisme aerobik termasuk manusia, meliputi hidrogen peroksida (H_2O_2), ion superoksida ($\bullet O_2^-$), radikal peroksil ($\bullet OOH$), radikal hidroksil ($\bullet OH$), singlet oksigen (1O_2), radikal nitrik oksida ($NO\bullet$), radikal nitrogen dioksida ($NO_2\bullet$) dan radikal alkoksil ($RO\bullet$) (Clarkson, 1995; Halliwell & Gutteridge, 1999; Suryohudoyo, 2000). Di dalam tubuh sebenarnya juga terdapat beberapa senyawa radikal selain ROS, yang umumnya dikelompokkan berdasarkan nama atomnya seperti radikal karbon, radikal sulfur dan radikal nitrogen (Halliwell & Gutteridge, 1999).

2.2.1 Pembentukan ROS

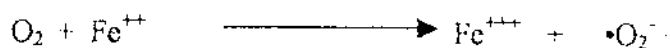
2.2.1.1 Ion superoksida ($\bullet\text{O}_2^-$)

$\bullet\text{O}_2^-$ dibentuk dengan menambahkan satu elektron terhadap oksigen (Young & Wodside, 2001), melalui beberapa cara, antara lain :

1. reaksi yang dikatalisis oleh enzim-enzim tertentu seperti santin oksidase (XO) dan aldehyd oksidase. Sebagai contoh dapat dilihat pada reaksi yang dikatalisis oleh XO dibawah ini :



2. sebagai reaksi sampingan yang melibatkan Fe^{++} seperti pada fosforilasi oksidatif, hidroksilasi oleh enzim monooksigenase (sitokrom P450 dan b4) dan oksigenase Hb, yang meliputi sekitar 3% Hb dari eritrosit setiap harinya, melalui reaksi :



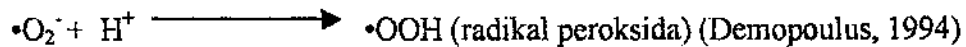
3. reaksi yang dikatalisis oleh NADH/NADPH oksidase yang terdapat dalam mitokondria dan granulosit.



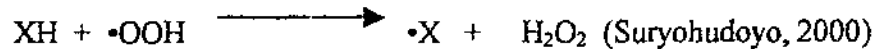
4. reaksi autooksidasi

beberapa molekul biologis yang penting, ada yang dapat menghasilkan $\bullet\text{O}_2^-$ melalui autooksidasi seperti gliseraldehid, FMNH₂, FADH₂ dan katekolamin (Halliwell & Gutteridge, 1999; Young & Woodside, 2001).

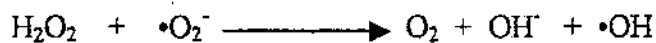
Sebenarnya $\bullet\text{O}_2^-$ tidak terlalu reaktif, tetapi dapat membentuk radikal yang lebih reaktif yaitu radikal peroksida dan $\bullet\text{OH}$. $\bullet\text{O}_2^-$ membentuk radikal peroksida melalui reaksi:



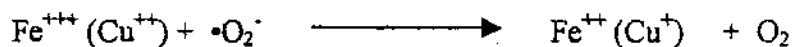
radikal peroksida sangat reaktif dan lebih berbahaya dibandingkan dengan hidrogen peroksida, karena dapat menghasilkan radikal baru dan hidrogen peroksida :



$\bullet\text{O}_2^-$ akan sangat berbahaya jika terdapat bersamaan dengan H_2O_2 karena akan membentuk $\bullet\text{OH}$ melalui reaksi :

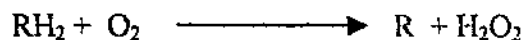


Reaksi diatas dikenal dengan reaksi Haber-Weiss, memerlukan Fe^{+++} (Cu^{++}) dan diperkirakan melalui 2 tahap yaitu (Ji, 1999; Suryohudoyo, 2000) :

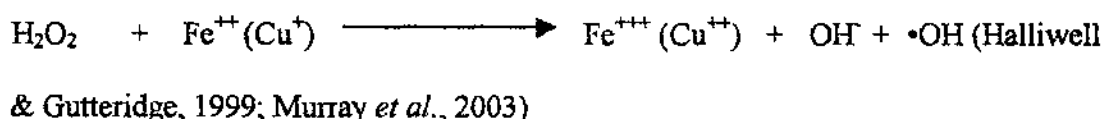


2.2.1.2 Hidrogen peroksida (H_2O_2)

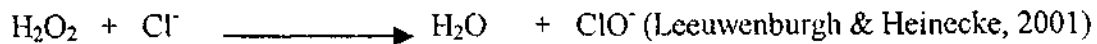
Hidrogen peroksida terutama terbentuk karena aktifitas enzim-enzim oksidase yang terdapat dalam retikulum endoplasmik (mikrosom) dan peroksisom. Enzim-enzim tersebut mengkatalisis reaksi :



H_2O_2 merupakan oksidan yang kuat dan dapat menghasilkan 2 oksidan yang lain yaitu radikal hidroksil dan ion hipoklorit. H_2O_2 menghasilkan radikal hidroksil bila bereaksi dengan logam transisi (Fe^{++} dan Cu^+) melalui reaksi Fenton seperti di bawah ini:



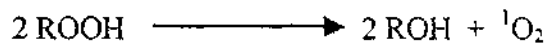
H_2O_2 juga dapat menghasilkan ClO^- melalui reaksi yang dikatalisis oleh enzim mieloperoksidase yang terdapat dalam sel-sel radang seperti monosit dan neutrofil :



2.2.1.3 Singlet oksigen ($^1\text{O}_2$)

Singlet oksigen merupakan bentuk yang jauh lebih reaktif dibanding oksigen biasa (O_2 dalam bentuk *ground state* atau disebut juga triplet oksigen). $^1\text{O}_2$ terbentuk melalui reaksi-reaksi yang dikatalisis oleh enzim-enzim tertentu antara lain :

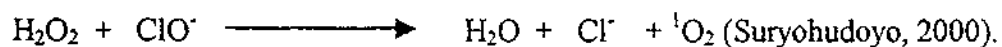
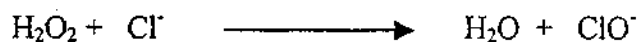
- enzim monooksigenase yang menggunakan sitokrom P450, apabila enzim tersebut menggunakan peroksil sebagai substrat :



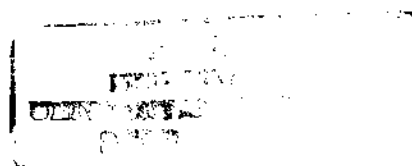
- enzim prostaglandin endoperoxida sintetase, suatu enzim yang berperan dalam pembentukan prostaglandin dari asam arakidonat:



- reaksi yang dikatalisis oleh enzim mieloperoksidase apabila ion hipoklorit yang terjadi bereaksi dengan H_2O_2 yang kedua.



- Paparan sinar ultraviolet juga menghasilkan $^1\text{O}_2$ (Young & Woodside, 2001)



2.2.1.4 Radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$)

Radikal hidroksil merupakan radikal yang sangat reaktif dan dapat mengoksidasi berbagai molekul biologis tubuh sehingga dianggap sebagai senyawa yang paling destruktif. $\bullet\text{OH}$ dapat terbentuk melalui reaksi Fenton dan Haber-Weiss serta melalui berbagai reaksi seperti:

- $\text{HClO} + \text{Fe}^{++} (\text{Cu}^+) \longrightarrow \text{Fe}^{+++} (\text{Cu}^{++}) + \text{Cl}^- + \bullet\text{OH}$
- degradasi dari : $\text{ONOOH} \longrightarrow \text{NO}_2\bullet + \bullet\text{OH}$
- pembelahan homolitik dari air : $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \bullet\text{OH} + \bullet\text{H}$ (Halliwell & Gutteridge, 1999; Suryohudoyo, 2005).

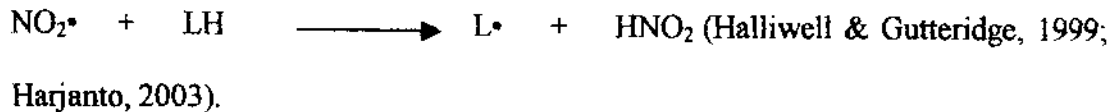
2.2.1.5 Radikal nitrik oksida ($\text{NO}\bullet$)

Radikal nitrik oksida disintesis dari asam amino arginin dengan bantuan enzim NOS. $\text{NO}\bullet$ tidak terlalu reaktif bahkan berperan pada berbagai proses fisiologis seperti proses vasodilatasi. $\text{NO}\bullet$ dapat membentuk senyawa lain yang lebih reaktif seperti $\text{NO}_2\bullet$ dan ONOO^- seperti pada reaksi dibawah ini :



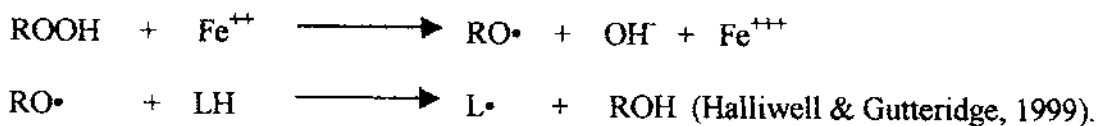
2.2.1.6 Radikal nitrogen dioksida ($\text{NO}_2\bullet$)

Radikal nitrogen dioksida dibentuk melalui reaksi antara $\text{NO}\bullet$ dan $\bullet\text{O}_2^-$. $\text{NO}_2\bullet$ juga terdapat didalam udara sebagai bahan polutan asap mesin serta pada peristiwa kebakaran. $\text{NO}_2\bullet$ lebih reaktif dari $\text{NO}\bullet$ dan dapat mengoksidasi molekul lemak :



2.2.1.7 Radikal alkoksil (RO•)

Radikal alkoksil dapat terbentuk melalui reaksi antara logam transisi dengan peroksil . RO• yang terbentuk dapat mengoksidasi asam lemak seperti pada reaksi berikut ini :

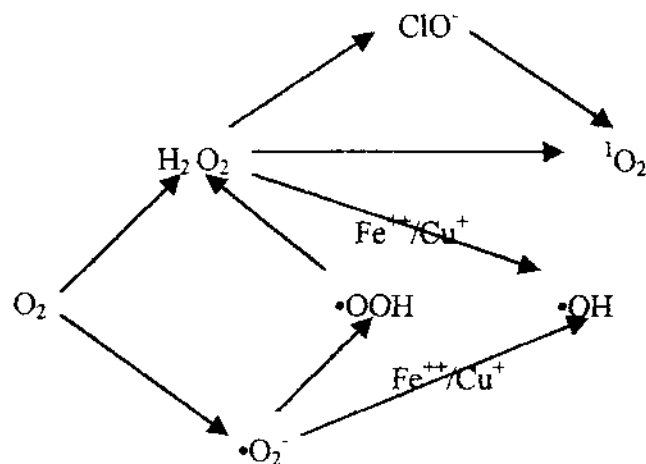


2.2.2 Dampak negatif ROS

Dampak negatif ROS timbul karena reaktifitasnya yang dapat merusak komponen-komponen sel yang penting untuk mempertahankan integritas dan kehidupan sel. Diantara ROS, •OH merupakan senyawa yang paling berbahaya karena reaktifitasnya sangat tinggi. Pada sistem biologis peristiwa pembentukan •OH secara langsung hanya sedikit. •OH banyak dibentuk melalui reaksi Haber-Weiss dan reaksi Fenton, yang membutuhkan logam transisi (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001). •OH dapat merusak tiga jenis senyawa yang penting dalam mempertahankan integritas sel yaitu :

1. Asam lemak, khususnya asam lemak tak jenuh yang merupakan komponen penting fosfolipid dan glikolipid penyusun membran sel
2. DNA yang merupakan perangkat genetik sel

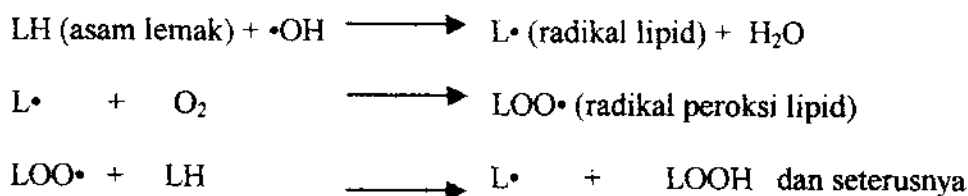
3. Protein, yang memegang peranan penting seperti enzim, reseptor, antibodi dan pembentuk matrik serta sitoskeleton (Halliwell & Gutteridge, 1999; Young & Woodside, 2001).



Gambar 2.1 Pembentukan dan hubungan Antar ROS
(sumber : Suryohudoyo, 2005)

2.2.2.1 Dampak negatif terhadap asam lemak

Fosfolipid dan glikolipid merupakan komponen terpenting dari membran sel yang mengandung asam lemak tak jenuh (asam-asam linoleat, linolenat dan arakidonat). Asam lemak tak jenuh ini sangat rentan terhadap serangan senyawa radikal terutama •OH. Serangan •OH dapat menimbulkan reaksi rantai yang dikenal dengan nama peroksidasi lipid (*lipid peroxidation*) :



Akibat akhir dari reaksi rantai ini adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang bersifat toksik terhadap sel, antara lain berbagai macam senyawa aldehid seperti MDA, 9-hidroksi nonenal serta bermacam-macam hidrokarbon seperti etana (C_2H_6) dan pentana (C_5H_{12}) yang dikeluarkan melalui pernafasan (Clarkson, 1995). Selain itu dapat pula terjadi ikatan silang antara 2 rantai asam lemak atau antara asam lemak dan peptida yang timbul karena reaksi 2 radikal. Hal tersebut menyebabkan kerusakan parah membran sel sehingga membahayakan kehidupan sel (Halliwell & Gutteridge, 1999; Suryohudoyo, 2000). Adanya kerusakan membran sel ditandai dengan meningkatnya enzim-enzim intra seluler di darah seperti kreatinin fosfo kinase dan laktat dehidrogenase (Patellongi, 1999).

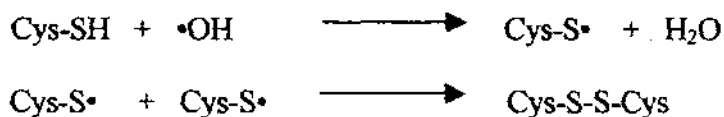
2.2.2.2 Dampak negatif terhadap DNA

Radikal bebas dapat menimbulkan beberapa perubahan pada DNA, seperti hidroksilasi timin dan sitosin, pembukaan inti purin dan pirimidin serta terputusnya rantai fosfodiester DNA. Kerusakan ini akan diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA (*DNA repair system*). Tetapi jika kerusakan tersebut parah, tidak akan dapat diperbaiki dan replikasi sel akan terganggu. Masalahnya perbaikan DNA ini, justru sering menimbulkan mutasi, karena kesalahan sistem perbaikan DNA (*error prone*). Apabila mutasi ini mengenai gen-gen tertentu dapat menimbulkan keganasan (Wijaya, 1996; Evan & Burkdorver, 1992). Serangan radikal bebas terhadap DNA dapat menghasilkan beberapa senyawa metabolit seperti 8-deoksiguanosin dan timin glikol (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Kerusakan DNA dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung. Reaksi dengan ROS secara langsung dapat terjadi pada molekul gula, basa maupun nukleoprotein. Kerusakan tidak langsung dapat terjadi antara lain sebagai akibat kenaikan kalsium sitoplasma, yang dapat mengaktifasi enzim endonuklease, sehingga pemecahan DNA meningkat (Harjanto, 2004).

2.2.2.3 Dampak negatif terhadap protein

Oksidan dapat bereaksi dengan asam-asam amino penyusun protein terutama sistein. Sistein mengandung gugus sulfhidril (SH) yang sangat peka terhadap serangan radikal bebas seperti radikal hidroksil :



Pembentukan ikatan disulfida ini (-S-S-) menimbulkan ikatan intra atau antar molekul sehingga protein seperti enzim, reseptor dan pompa ion kehilangan fungsi biologisnya (Halliwell & Gutteridge, 1999). Malfungsi pompa ion dapat meningkatkan produksi oksidan. Sebagai contoh adalah pompa kalsium. Pompa kalsium mengandung protein yang mempunyai gugus SH, sehingga rentan terhadap serangan oksidan. Malfungsi pompa kalsium menyebabkan kenaikan konsentrasi kalsium di sitoplasma (Halliwell & Gutteridge, 1999). Kenaikan kadar kalsium sitoplasma merangsang aktivitas beberapa enzim seperti kalpain dan NOS sehingga terjadi hiperaktivasi. Rangsangan terhadap kalpain menyebabkan XO berubah menjadi XO yang dapat meningkatkan produksi $\cdot\text{O}_2^-$ (Maslachah, 2001). Rangsangan aktivitas NOS menyebabkan peningkatan produksi $\text{NO}\cdot$ dari arginin. $\text{NO}\cdot$ dapat

bereaksi dengan $\bullet\text{O}_2^-$ menghasilkan ONOO^- yang sangat reaktif (Halliwell & Gutteridge, 1999).

2.2.3 Dampak positif oksidan

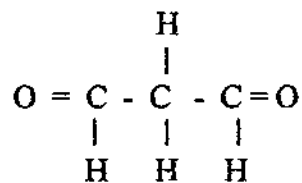
Oksidan dimanfaatkan oleh tubuh untuk melawan organisme patogen. Sel-sel khusus yaitu sel-sel radang (*inflammatory sel*) seperti granulosit, monosit dan makrofag dapat menghasilkan oksidan seperti H_2O_2 , $\bullet\text{O}_2^-$, $\bullet\text{OOH}$, $\bullet\text{OH}$ dan $^1\text{O}_2$ untuk menghadapi organisme patogen. Oksidan dapat menghancurkan mikroorganisme tersebut (Bast *et al.*, 1991; Suryohudoyo, 2000).

Peran fisiologis ROS mempunyai dimensi yang luas meliputi berbagai jenis sel dan sistem. Sebagai contoh misalnya ROS dapat bertindak sebagai *second messenger*, bisa sebagai aktifator, autoamplifikator, trans aktifator dan koaktifator. Misalnya H_2O_2 dapat bertindak sebagai autoamplifikator pada reseptor insulin (Harjanto, 2005).

2.2.4 Malondialdehid (MDA)

Untuk mendeteksi peningkatan ROS dapat dilakukan dengan metode langsung maupun tidak langsung, tetapi karena umur ROS sangat pendek (10^{-6} - 10^{-12} detik) menyebabkan kesulitan untuk mengukur kadar ROS secara langsung (Clarkson, 1995), sehingga metode tidak langsung lebih banyak digunakan (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001). Salah satu metode tidak langsung yang biasa dipakai adalah metode *finger printing*. Metode ini mengukur senyawa radikal dengan mengukur kadar senyawa yang dihasilkan oleh reaksi senyawa radikal dengan

molekul target (Williams & Jeffrey, 2000; Hawkins & Davies, 2001). Sebagai contoh misalnya metode TBARS (*Thio Barbituric Acid Reactive Substance*). Salah satu kekurangan metode ini adalah kurang spesifik dibandingkan dengan metode langsung (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001).



Gambar 2.2 Struktur MDA (Sumber: Halliwell & Gutteridge, 1999)

Metode TBARS digunakan untuk mengukur hasil peroksidasi lipid yaitu MDA. MDA adalah suatu aldehid, dimana sebagai senyawa endogen banyak terdapat didalam darah dan membran sel. MDA juga dihasilkan melalui oksidasi asam lemak tak jenuh oleh radikal bebas (Sudjarwo, 1995).

2.3 Anti Oksidan

Organisme aerobik dapat bertahan dari serangan ROS karena mempunyai sarana untuk meredam dampak negatif oksidan, yaitu senyawa-senyawa antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa-senyawa pemberi elektron (*electron donor*). Dalam arti biologis pengertian antioksidan lebih luas, yaitu meliputi senyawa-senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan, termasuk enzim-enzim dan protein-protein pengikat logam (Suryohudoyo, 2000; Murray *et al.*, 2003). Antioksidan juga dapat diartikan sebagai zat yang bila terdapat pada konsentrasi dibawah bahan sasaran

oksidasi dapat mencegah atau menghambat proses oksidasi terhadap bahan sasaran tersebut (Harjanto, 2003).

2.3.1 Klasifikasi antioksidan

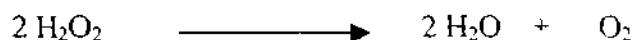
Berdasarkan mekanisme kerjanya antioksidan dapat dibagi menjadi 3 golongan yaitu antioksidan pencegah (*preventive antioxidants*), antioksidan pemutus rantai (*chain breaking antioxidants*) dan antioksidan pemulih. Berdasarkan sifat kelarutannya antioksidan dibagi menjadi antioksidan larut lemak (*lipid soluble*) seperti tokoferols dan beta karotin serta antioksidan yang larut air (*water soluble*) seperti asam askorbat, glutathione dan sistein. Berdasarkan sumbernya dapat dibagi menjadi antioksidan endogen dan eksogen (Halliwell & Gutteridge, 1999; Harjanto, 2003).

a. Antioksidan Pencegah

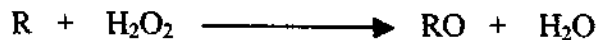
Antioksidan pada dasarnya bertujuan mencegah terbentuknya $\bullet\text{OH}$. Untuk membentuk $\bullet\text{OH}$ diperlukan 3 komponen, yaitu logam transisi (Fe^{++} atau Cu^+), H_2O_2 dan ion superoksida ($\bullet\text{O}_2^-$). Untuk mencegah adanya ion $\text{Fe}^{++}/\text{Cu}^+$ bebas berperan beberapa protein penting yaitu transferin atau feritin (untuk Fe) serta seruloplasmin atau albumin (untuk Cu). Penimbunan $\bullet\text{O}_2^-$ dicegah oleh enzim superoksida dismutase (SOD) yang mengkatalisis reaksi dismutasi $\bullet\text{O}_2^-$.

$2 \bullet\text{O}_2^- + 2 \text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$, sedangkan penimbunan H_2O_2 dicegah melalui aktifitas 2 jenis enzim yaitu :

1. katalase, yang mengkatalisis reaksi dismutasi H_2O_2 :



2. peroksidase, yang mengkatalisis reaksi :

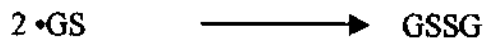
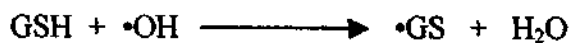


Diantara berbagai peroksidase, yang paling penting adalah glutathion peroksidase, yang mengkatalisis reaksi :

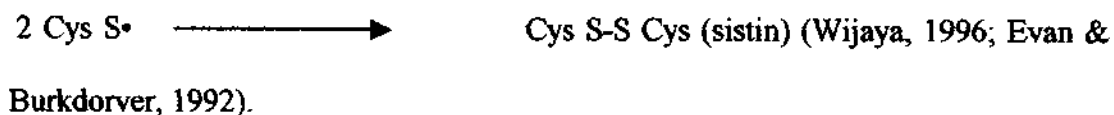


apabila $\bullet OH$ masih terbentuk, masih dapat diredam dengan melibatkan senyawa-senyawa yang mengandung gugus SH, seperti GSH dan sistein (Cys-SH)

GSH :



Cys-SH :



b. Antioksidan Pemutus Rantai

Antioksidan pemutus rantai bekerja dengan mencegah reaksi rantai berlanjut, atau menghentikan reaksi rantai berlanjut. Termasuk dalam kelompok ini diantaranya vitamin E, vitamin C, β karotin, GSH dan sistein. Vitamin E terdiri dari empat senyawa yaitu alfa, beta, gamma dan delta tokoferol. Karena keberadaannya dalam

membran, vitamin E dapat bereaksi dengan radikal lipid (L^\bullet) dan peroksilipid (LOO^\bullet).

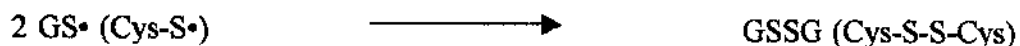
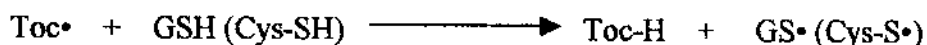


Radikal vitamin E (Toc^\bullet) tidak terlalu reaktif karena terjadi resonansi, meskipun demikian radikal vitamin E perlu juga dihilangkan melalui tiga cara, yaitu :

- radikal vitamin E mengalami reaksi-reaksi intra molekul menghasilkan senyawa nonradikal
- setelah bergeser kearah permukaan molekul, radikal vitamin E bereaksi dengan vitamin C (Asc-H_2) dan menghasilkan radikal vitamin C (Asc^\bullet):



- radikal vitamin C kemudian dihilangkan melalui reaksi dismutasi yang menghasilkan vitamin C dan dihidro asam askorbat (DHAA). Radikal vitamin E dapat bereaksi dengan glutathion atau sistein yang juga terdapat dalam sitosol :



(Suryohudoyo, 2000).

c. Antioksidan Pemulih

Antioksidan pemulih atau sistem perbaikan berperan memulihkan atau memperbaiki molekul antioksidan dan molekul tubuh lain yang teroksidasi. Contoh antioksidan pemulih diantaranya:

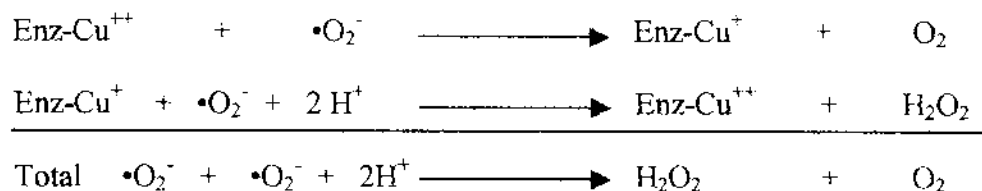
- untuk perbaikan molekul lemak: peroksidase, lesitin kolesterol asil transferase, dan fosfolipase
- untuk perbaikan molekul protein: GSH, metionin dan tioredoksin
- untuk perbaikan molekul DNA: nuklease dan polimerase (Halliwell & Gutteridge, 1999; Harjanto, 2003).

2.3.2 Peranan SOD sebagai antioksidan

Peranan SOD sebagai antioksidan sangat penting. SOD merupakan enzim utama yang mencegah/meredam dampak stres oksidatif. Pada eukariota dikenal 3 jenis SOD yaitu :

1. CuZnSOD sitoplasma
2. CuZnSOD ekstra seluler (EC SOD)
3. MnSOD yang terletak di mitokondria (Honda, 1999; Halliwell & Gutteridge, 1999)

CuZnSOD terdiri dari 2 subunit protein (dimer), masing-masing mempunyai *active site* yang mengandung ion Cu^{++} dan Zn^{++} . Zn^{++} tidak berperan pada proses katalisis, tetapi berperan pada stabilisasi SOD. Cu^{++} berperan pada proses katalisis reaksi dismutasi, seperti pada reaksi di bawah ini (Halliwell & Gutteridge, 1999) :



MnSOD mempunyai 4 buah subunit protein. Pada umumnya mengandung ion Mn^{++} 0,5-1 per subunit. MnSOD lebih labil terhadap panas dan bahan kimia

seperti deterjen dibandingkan dengan CuZnSOD. MnSOD aktifitasnya menurun pada PH alkalis, tetapi lebih tahan terhadap serangan H_2O_2 dibandingkan dengan CuZnSOD. Walaupun eritrosit tidak mempunyai mitokondria, tetapi masih mengandung MnSOD dalam jumlah yang kecil (Halliwell & Gutteridge, 1999).

2.3.2 Sistem antioksidan eritrosit

Stres oksidatif diduga menjadi salah satu faktor penyebab kerusakan pada eritrosit selama dan setelah latihan (Enturk *et al.*, 2001). Eritrosit mempunyai fungsi fisiologis yang vital, tetapi eritrosit rentan terhadap serangan oksidan. Salah satu penyebabnya karena eritrosit tidak mempunyai inti sel, sehingga tidak mampu mempertahankan kadar antioksidan dengan cara mensintesisnya (Aslan *et al.*, 1998). Beberapa oksidan seperti $\bullet OOH$ dan H_2O_2 dapat menembus membran eritrosit (Halliwell & Gutteridge, 1999), sehingga serangan oksidan menyebabkan eritrosit menjadi lebih mudah lisis (Yunus, 2001). Untuk mengatasi serangan oksidan tersebut, eritrosit mempunyai sistem antioksidan yang kompleks terdiri dari GSH, katalase, SOD, glutathion peroksidase, vitamin C dan tokoferol (Halliwell & Gutteridge, 1999).

2.4 Latihan Olahraga Anaerobik

Bompa, 1994 menyatakan bahwa latihan merupakan seluruh proses yang sistematis yang dilakukan secara berulang-ulang dalam jangka waktu yang panjang, dengan tujuan meningkatkan efisiensi faal tubuh. Ditinjau dari ketersediaan oksigen dan sumber energi yang dominan, latihan dibagi menjadi dua yaitu latihan olahraga

aerobik dan anaerobik. Latihan olahraga aerobik adalah program latihan yang dinamis dikerjakan dalam keadaan oksigen cukup atau kebutuhan oksigen terpenuhi. Sumber energi terutama berasal dari glikolisis aerobik, glikogenolisis di otot dan hati serta oksidasi asam lemak. Sedangkan latihan olahraga anaerobik adalah latihan dengan kerja yang singkat berulang-ulang dengan intensitas yang tinggi dan oksigen tidak mencukupi atau kebutuhan oksigen tidak terpenuhi. Sumber energi didapat terutama berasal dari sistem ATP-PC (*alactic system*) dan glikolisis anaerobik (*lactic system*) (Fox, 1998; Soekarman, 1989).

Latihan olahraga aerobik pada umumnya mempunyai intensitas kurang dari 80% intensitas maksimal. Sedangkan latihan olahraga anaerobik mempunyai intensitas yang lebih tinggi (Fox, 1998). Intensitas latihan dapat dinyatakan dengan prosentase terhadap kemampuan maksimal (VO_2 maksimal/denyut jantung), konsumsi energi persatuan waktu atau kecepatan gerakan. Berdasarkan intensitasnya latihan dapat dibagi menjadi 6 kelompok, seperti pada tabel berikut ini :

Tabel 2.1 Intensitas Latihan

No	Intensitas	Prosentase terhadap kemampuan maksimal (%)
1	Supermaksimal	100-105
2	Maksimal	90-100
3	Submaksimal	80-90
4	Medium	70-80
5	Intermediet	50-70
6	Rendah	30-50

(Sumber: Bompa, 1994)

2.4.1 Hubungan latihan olahraga anaerobik dan peningkatan produksi ROS

Latihan akan meningkatkan metabolisme (Chevion *et al.*, 2001) dan konsumsi oksigen jaringan (Ji, 1999). Selama latihan konsumsi oksigen tubuh dapat meningkat 20x, sedangkan di otot dapat meningkat sampai 100x (Ji, 1999). Oksigen diangkut oleh hemoglobin (Hb) dan dilepaskan ke jaringan. Pada saat pengangkutan ini, dapat terjadi reduksi univalen dari O_2 menjadi $\bullet O_2^-$ (sekitar 1-3%). Peningkatan konsumsi O_2 akan meningkatkan produksi $\bullet O_2^-$. Kebutuhan ATP juga meningkat melebihi kemampuan tubuh untuk membentuk/menyediakannya (Chevion *et al.*, 2003). Organisme aerobik memerlukan oksigen untuk menghasilkan ATP. Oksigen berperan sebagai molekul penerima elektron pada fosforilasi oksidatif di mitokondria. Dalam keadaan biasa sekitar 3-5% oksigen diubah menjadi ROS di mitokondria, makin tinggi kebutuhan ATP dan makin tinggi oksigen yang dipakai pada fosforilasi oksidatif, akan meningkatkan produksi ROS di mitokondria (Sjodin, *et al.* 1990). Peningkatan produksi ROS yang melebihi kemampuan tubuh untuk menetralsirnya disebut stres oksidatif (*oxidative stress*) (Tjokropawiro & Sutjahjo, 1995).

2.4.2 Peranan santin oksidase dalam pembentukan ROS

Enzim santin oksidase (XO) terbentuk dari enzim lain yaitu santin dehidrogenase (XD) yang mengkatalisis reaksi sebagai berikut :



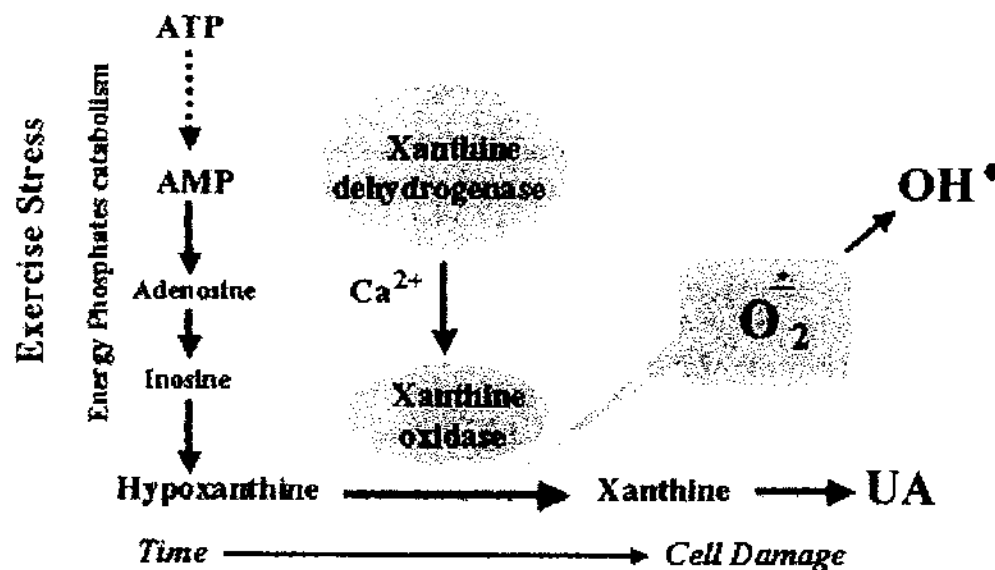
XD terutama ditemukan pada sel endotel pembuluh darah, otot rangka dan jantung (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001)

Dalam keadaan *ischemia* atau hipoksemia, XD berubah menjadi XO yang bersifat irreversibel, melalui proses proteolisis dengan bantuan enzim protease yang tergantung kalsium. Aktivasi protease ini menyebabkan pemecahan peptida dari XD yang menyebabkan perubahan bentuk menjadi XO :



Oksidasi ini menggunakan oksigen dan NAD^+ sebagai pemberi elektron. Molekul O_2 direduksi menjadi $\bullet\text{O}_2^-$ (Sjodin *et al.*, 1990).

Selama latihan sistem adenilat kinase sangat aktif. Sistem adenilat kinase digunakan untuk menghasilkan ATP dan AMP dari dua molekul ADP, sehingga dapat menyebabkan penumpukan AMP. AMP kemudian dipecah menjadi hipoksantin (HX). Kadar hipoksantin meningkat, menyebabkan aktifitas XO juga meningkat. Pada fase istirahat dari latihan olahraga anaerobik, konsumsi oksigen tetap tinggi, terjadi kelebihan oksigen secara relatif. Suplai oksigen oleh sistem transport O_2 lebih tinggi dari yang dibutuhkan (Golnich, 1986). Oksigen tersebut akan digunakan diantaranya oleh XO yang terbentuk selama fase latihan dan membentuk $\bullet\text{O}_2^-$ (Sjodin *et al.*, 1990).



Gambar 2.2 Peranan XO meningkatkan ROS (sumber : Chevion *et al.*, 2003)

2.4.3 Asam laktat merubah ion superoksida menjadi lebih reaktif

Pada fase kerja dari latihan olahraga anaerobik, terjadi insufisiensi oksigen pada mitokondria sel otot. Pembentukan ATP melalui glikolisis anaerobik, juga menghasilkan asam laktat. Bila glikolisis anaerobik berlangsung terus, mengakibatkan akumulasi asam laktat dalam darah (Astrand, 1986, Ganong 1999). Akumulasi asam laktat dalam darah dapat merubah $\bullet\text{O}_2^-$ menjadi bentuk yang lebih reaktif yaitu radikal peroksil (Demopoulus, 1994).

2.4.4 Katekolamin meningkatkan produksi ROS

Selama latihan, produksi katekolamin akan meningkat, hal ini memicu terbentuknya radikal bebas. Epinefrin, norepinefrin, L-Dopa dan dopamin dapat bereaksi secara langsung dengan oksigen (autooksidasi) dan menghasilkan $\bullet\text{O}_2^-$ (Katch, 1994). Untungnya laju reaksi ini sangat lambat, tetapi jika dikatalisis oleh logam transisi, reaksinya menjadi lebih cepat (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Peningkatan kadar epinefrin pada kondisi stres dapat mencapai 50 kali dibandingkan waktu istirahat (Alanko *et al.*, 1992). Epinefrin secara umum berperan merangsang laju metabolik. Efek metabolik epinefrin diantaranya adalah glikogenolisis di hati dan otot rangka, mobilisasi asam lemak bebas serta peningkatan laktat plasma (Ganong, 1999).

Epinefrin dapat meningkatkan lipolisis melalui aktivasi enzim hormon sensitive lipase (Murray *et al.*, 2003). Peningkatan lipolisis menyebabkan aktivitas peroksisom juga meningkat. Hal ini menyebabkan peningkatan produksi oksidan terutama (H_2O_2) (Lodish, 1995). Epinefrin sendiri dapat menghasilkan ROS saat mengalami inaktivasi (Clarkson, 1995).

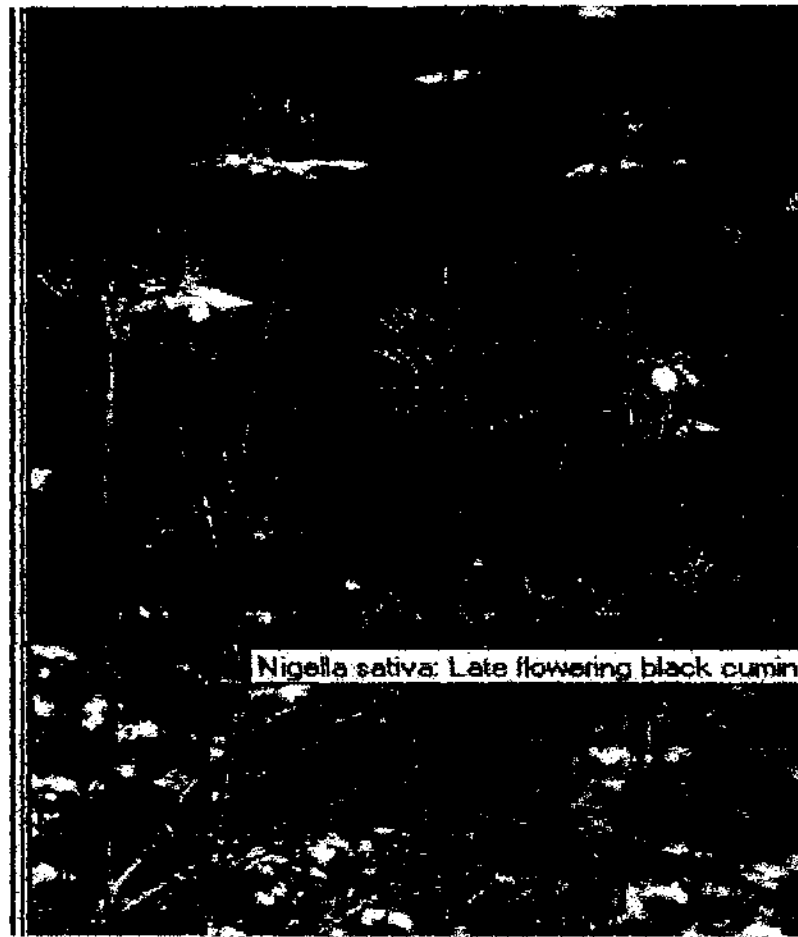
2.5 Jinten Hitam

Jinten hitam (*N. sativa*) digolongkan dalam famili Ranunculaceae, banyak didapatkan di Timur Tengah, Asia barat dan Eropa. Dinegara-negara Arab jinten hitam dikenal dengan Al-sauda, Habbet el-Baraka, Kamaun Aswad, Schumiz dan Khodria. Di Pakistan, India dan Srilanka disebut Kalvanji, Asmut, Gurat, Aof dan Aosetta. Dalam bahasa Inggris disebut Black Seed, Black Cumin dan Black Caraway. (Katzer, 2004)

Taksonomi dari jinten hitam adalah sebagai berikut :

Divisi	: Magnoliophyta
Klas	: Magnoliopsidae
Subklas	: Magnoliidae
Ordo	: Ranunculales
Famili	: Ranunculaceae
Genus	: <i>Nigella</i>
Spesies	: <i>Nigella sativa</i>

Di negara-negara Timur Tengah dan Asia Barat, jinten hitam digunakan sebagai obat tradisional untuk menjaga kesehatan dan mengatasi beberapa penyakit seperti asma, influenza, rematik, penurunan panas serta untuk mengatasi infeksi bakteri dan parasit. Jinten hitam juga dipakai pada kasus sengatan lebah dan kalajengking serta gigitan ular, kucing dan anjing. (El-Kadi & Kandil, 1986; Al-Jishi, 2000).



Gambar 2.3 Pohon dan Bunga Jinten Hitam (Sumber: Katzer, 2004)



Gambar 2.4 Biji Jinten Hitam (Sumber: Katzer, 2004)

Beberapa penelitian membuktikan khasiat jinten hitam, diantaranya menghambat kontraksi uterus (Aqel & Shaheen, 1996), mengatasi konstiksi otot polos bronkus (El- Tahir, 1999), meningkatkan aktifitas makrofag (Haq *et al.*, 1995), analgesik antipiretik dan antiinflamasi (Houghton *et al.*, 1995). El-Kandi dan Kandil membuktikan efek anti kanker dari jinten hitam. Jinten hitam juga mempunyai efek menurunkan kadar glukosa darah (Al-Awadi & Gumma). Selain itu jinten hitam juga mempunyai efek anti oksidan (El-Daly, 1998 ; Daba & Abdel Rahman, 1998; Nagi *et al.* 1999; Badary *et al.*, 1999). Khasiat terapi yang luas dari jinten hitam disebabkan karena kandungan bahan berkhasiat/aktifnya yang komplek mengandung lebih dari seratus nutrisi berharga (Daba & Abdel Rahman, 1989). Komposisi bahan yang dikandung jinten hitam dapat dilihat pada tabel 2.2.

Thymoquinon (*2-isopropyl-5-methyl-1,4 benzoquinone*) yang dikandung oleh jinten hitam ternyata dapat meningkatkan kadar GSH serta penurunan sekresi histamin dilambung (El Dakhakhany, 2000). Thymoquinon mempunyai kemampuan menghambat peroksidasi non enzimatis pada liposom fosfolipid otak sapi jantan. (Houghton *et al.*, 1995)

Induksi dengan *tert-butyl hydroperoxide* (TBHP) pada sel hepar dapat menaikkan kadar ALT dan AST serta penurunan GSH intra sel. Pemberian TBHP bersama dengan thymoquinon, menyebabkan pencegahan terhadap peningkatan ALT, AST dan penurunan GSH secara bermakna (Daba & Abdel Rahman, 1998). Thymoquinon juga dapat mencegah penurunan kadar GSH dan aktifitas GST (glutation-S transferase) pada tikus yang diinduksi dengan 20-methyl cholantrene (Badary & Gamel, 2001).

Tabel 2.2 Komposisi Bahan yang Dikandung dalam Jinten Hitam

Group	Sub-group	Sub-subgroup
<i>Fixed oil</i> (32-40 %)	Asam lemak	Palmitat, stearat, asam beta-sitosterol, sikloekalenol, sikloartenol, sterol ester dan sterol glukosida
<i>Volatile oil</i> (0.4-0.45 %)		Nigellon, timoquinon, timohydroquinon ditimoquinon, timol, karvakrol, α & β -pinen, d-limon, d-citronellol, p-simen dan 2-(2-metoksipropil)-5-metil-1,4-benzenediol
Protein (16-19.9 %)	Asam amino	Arginin, asam glutamat, leusin, lisin, methionin, tyrosin, prolin and threonin.
Alkaloid		Nigellisin, nigellidin, nigellimin-N-oxida
Kumarin		6-metoksi-kumarin, 7-hidroksi-kumarin dan 7-oksi-kumarin
Saponin		Alfa-hedrin
Mineral (1.79-3.74 %)	Triterpen Steroid	Steril-glukosida, asetil-steryl-glukosida
		kalsium, fosfor, kalium, natrium dan besi
Karbohidrat (33.9%)		
Serat (5.5 %)		
Air (6 %)		

(Sumber: Rhandawa & Al-Ghamdi, 2002)

Burits dan Bucar menyatakan bahwa minyak esensial jinten hitam yang mengandung thymoquinon, carvacrol, t-anethol dan 4-terpineol, mempunyai efek antioksidan yang mempunyai kemampuan $\bullet\text{OH}$ scavenging. (Burits & Bucar, 2000). Thymoquinon sebagai kandungan utama pada jinten hitam dapat mencegah penurunan kadar GSH ginjal dan penumpukan peroksida lipid pada ginjal tikus yang diinduksi dengan ifosfamide (IFO) (Badary *et al.*, 1999).

Selenium, vitamin E dan jinten hitam dapat mencegah fibrosis dan sirosis pada liver kelinci yang diinduksi dengan tetra klorida (CCl₄). Fibrosis yang terjadi pada kelompok kelinci yang diberi selenium dan vitamin E, lebih sedikit dari kelompok kontrol tetapi lebih nyata dibanding kelompok yang diberi jinten hitam. Sedangkan aktivitas SOD pada kelompok tersebut lebih rendah secara bermakna dibandingkan kelompok kontrol. (Turkdogan *et al.*, 2001).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual

Pada latihan olahraga anaerobik terjadi peningkatan produksi ROS yang cukup besar. Peningkatan ini terjadi pada fase latihan maupun fase pulih asal. Pada fase latihan terjadi peningkatan metabolisme (Chevion *et al.*, 2003) dan konsumsi oksigen (Ji, 1999). Peningkatan konsumsi oksigen menyebabkan reduksi univalen O_2 oleh Hb meningkat, menghasilkan $\bullet O_2^-$ (Halliwell & Gutteridge, 1999). Kebutuhan energi yang cukup besar tidak diimbangi dengan suplai oksigen yang cukup, sehingga terjadi keadaan hipoksemia. Pada kondisi hipoksemia XD berubah menjadi XO, dan menghasilkan $\bullet O_2^-$ (Sjodin *et al.*, 1990).

Pemenuhan energi pada fase latihan terutama melalui sistem fosfagen (ATP-PC) atau *alactic system* dan glikolisis anaerobik atau *lactic system* (Soekarman, 1989). Peningkatan glikolisis anaerobik menyebabkan peningkatan asam laktat di darah (Astrand, 1986). Asam laktat akan merubah $\bullet O_2^-$ menjadi lebih reaktif yaitu $\bullet OOH$ (Demopoulus, 1994).

Pada fase pulih asal, konsumsi oksigen tetap tinggi (Fox, 1998). Suplai oksigen yang mencukupi memungkinkan XO yang terbentuk selama fase latihan, mengkatalisis perubahan hipoksantin menjadi asam urat dan menghasilkan $\bullet O_2^-$. Keadaan ini justru mengakibatkan kerusakan jaringan, dikenal dengan *reperfusion injury* (Suryohudoyo, 2000).

Pada fase pulih asal juga terjadi sintesis ATP yang cukup besar (Soekarman, 1989). Peningkatan sintesis ATP dan konsumsi oksigen yang meningkat, menyebabkan fosforilasi oksidatif di mitokondria meningkat. Sekitar 3-5% oksigen yang masuk ke mitokondria berubah menjadi ROS (Sjodin *et al.*, 1990).

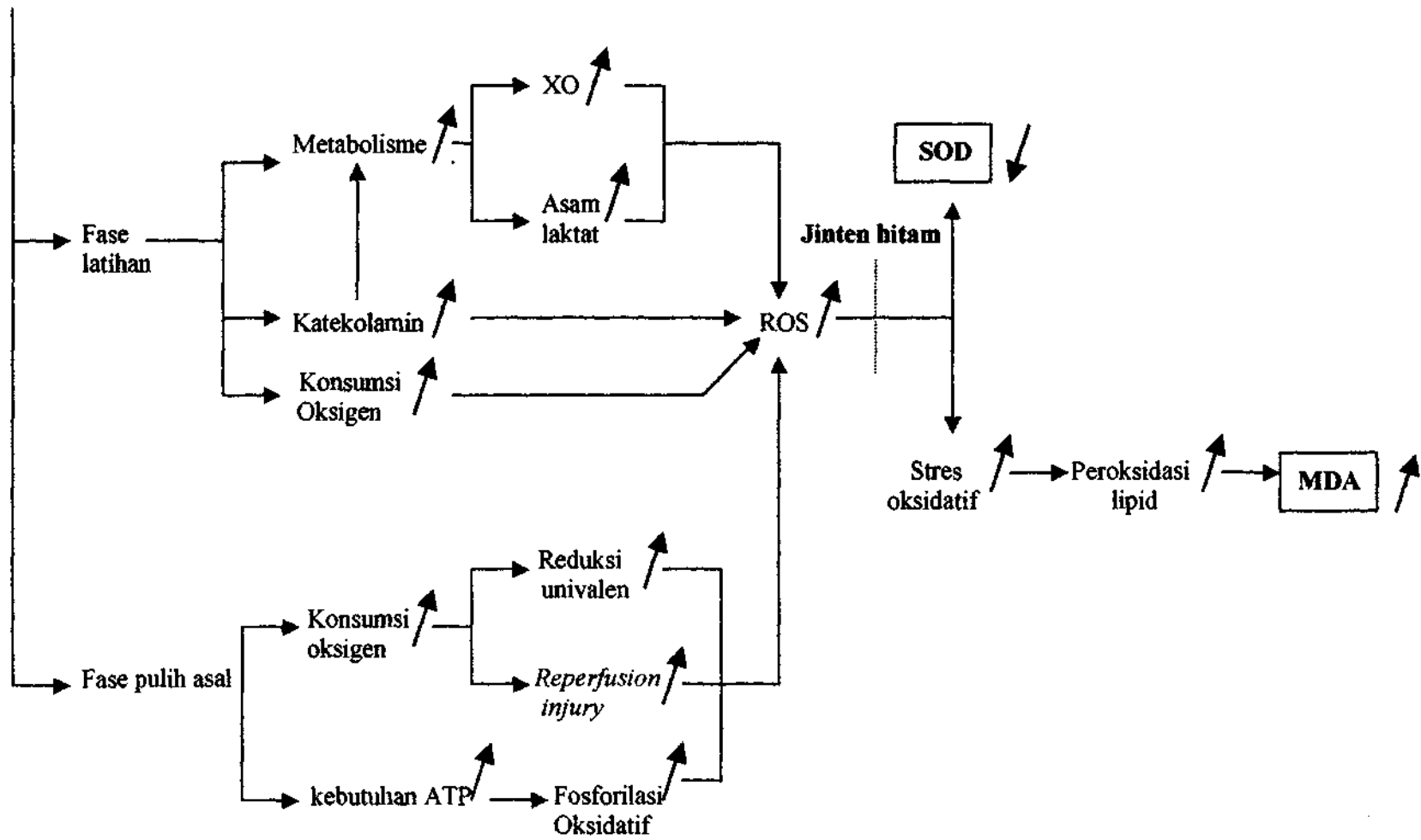
Latihan olahraga anaerobik juga menyebabkan produksi katekolamin meningkat, keadaan ini juga meningkatkan produksi ROS (Alanko *et al.*, 1992; Katch, 1994). Peningkatan ROS didalam tubuh akan berusaha dinetralisir oleh antioksidan endogen. Salah satunya adalah SOD, peningkatan ROS yang cukup besar dapat menurunkan kadar SOD. Keadaan ini mengakibatkan ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan, sehingga terjadi stres oksidatif (Patellongi, 1999).

Serangan ROS pada PUFA dapat menimbulkan reaksi rantai yang dikenal dengan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid mengakibatkan asam lemak terpotong-potong menghasilkan produk yang toksik seperti MDA, sehingga peningkatan peroksidasi lipid akibat peningkatan ROS dapat menyebabkan peningkatan MDA (Suryohudoyo, 2000).

Efek antioksidan dari jinten hitam diharapkan dapat menghambat terjadinya stres oksidatif akibat latihan olahraga anaerobik, sehingga peningkatan kadar MDA plasma dan penurunan aktivitas SOD eritrosit dapat dihindari.

Kerangka konseptual pada penelitian ini dapat dilihat pada bagan berikut ini :

Latihan olahraga anaerobik



(Bagan 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian)

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan tinjauan pustaka dan kerangka konseptual yang telah dijelaskan sebelumnya maka diajukan hipotesis penelitian sebagai berikut :

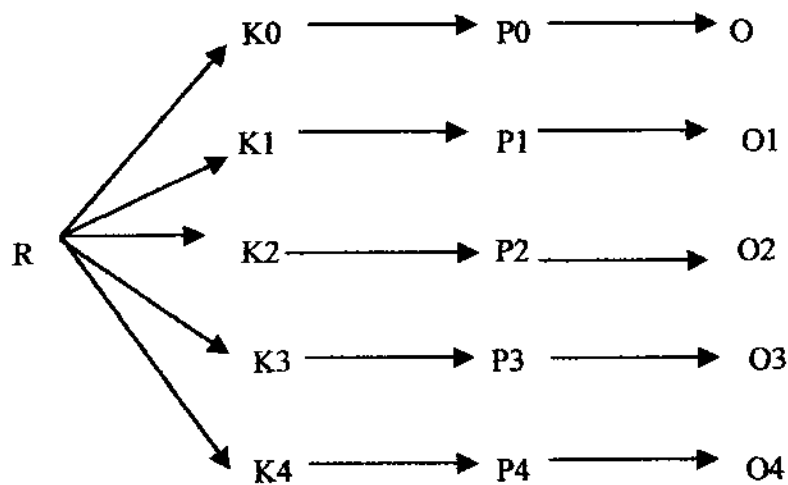
1. Pemberian ekstrak jinten hitam dapat menghambat peningkatan kadar MDA plasma tikus putih yang mendapat perlakuan latihan olahraga anaerobik
2. Pemberian ekstrak jinten hitam dapat menghambat penurunan aktivitas SOD eritrosit tikus putih yang mendapat perlakuan latihan olahraga anaerobik

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini tergolong jenis penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan rancangan *The post test only control group design*. Secara skematis rancangan metode tersebut dapat digambarkan sebagai berikut (Zainuddin, 2000):



Keterangan :

R : randomisasi

K : kelompok

P0 : diberikan aquadest sebagai kontrol/placebo per oral selama 5 hari

P1 : diberikan aquadest sebagai kontrol per oral selama 5 hari, 1 jam setelah pemberian terakhir dilakukan latihan renang

P2, 3, 4 : diberikan ekstrak jinten hitam per oral 1, 2 dan 4 ml/kgBB selama 5 hari, 1 jam setelah pemberian terakhir dilakukan latihan renang

O : pengambilan data post test

4.2 Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Rattus norvegicus* strain Wistar, jenis kelamin jantan, umur 2,5-3 bulan dengan berat badan antara 150-200 gram dan dalam keadaan sehat fisik yang ditandai dengan keadaan umum baik, suhu tubuh 37°C dan laju respirasi 210/menit (Wattimena *et al.*, 1996). Sampel diperoleh dari laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga.

Besar sampel yang digunakan 6 ekor untuk setiap kelompok perlakuan. Jadi besar sampel seluruhnya adalah 30 ekor. Besar sampel ini diperoleh berdasarkan rumus Higgins dan Kleinbaum (lampiran 1). Teknik pengambilan sampel dilakukan dengan *simple random sampling*.

Rumus penentuan besar sampel:

$$n = \frac{1}{1 - f} \times \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 S_c^2}{(X_c - X_t)^2}$$

dimana :

n = besar sampel

Z_{α} = nilai kesalahan (nilai kemaknaan) yang besarnya tergantung α .
Untuk $\alpha = 0,05$ maka $Z_{\alpha} = 1,96$.

Z_{β} = nilai kesalahan (nilai kemaknaan) yang besarnya tergantung β .
Untuk $\beta = 0,1$ maka $Z_{\beta} = 1,28$.

X_t = nilai rata-rata kelompok perlakuan

X_c = nilai rata-rata kelompok kontrol

S_c = simpangan baku kelompok kontrol

f = proporsi yang gagal

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi variabel

Klasifikasi variabel pada penelitian ini adalah :

1. Variabel bebas

sebagai variabel bebas pada penelitian ini adalah:

- a. dosis dan lama pemberian ekstrak jinten hitam
- b. jenis dan lama latihan olahraga anaerobik.

2. Variabel tergantung

sebagai variabel tergantung pada penelitian ini adalah:

- a. kadar MDA plasma
- b. aktivitas SOD eritrosit.

3. Variabel moderator

sebagai variabel moderator pada penelitian ini adalah:

- a. jumlah eritrosit
- b. PCV.

4.3.2 Definisi operasional variabel

1. Ekstrak jinten hitam

Ekstrak jinten hitam diperoleh dengan cara seperti pada lampiran 2. Ekstrak jinten hitam diberikan secara per sonde setiap hari selama 5 hari dengan dosis 1, 2 dan 4 ml/kgBB. Pemberian terakhir diberikan 1 jam sebelum latihan (Zaoui *et al.*, 2002).

2. Latihan olahraga anaerobik

Yang dimaksud latihan olahraga anaerobik dalam penelitian ini adalah latihan renang dengan menggunakan beban seberat 9% dari berat badan tikus dan diikatkan pada ekor tikus (5 cm dari ujung ekor) (Yunus, 2001). Lamanya waktu berenang adalah 80% dari waktu berenang maksimal yang ditentukan melalui penelitian pendahuluan (Fox, 1998; Yunus, 2001). Hasil penelitian pendahuluan untuk menentukan waktu lamanya berenang dapat dilihat pada lampiran 5.

3. Kadar MDA plasma

Kadar MDA plasma ditentukan dengan metode *Thiobarbituric acid reactive substance* (TBARS) dari Flower (Flower, 1973) yang dimodifikasi oleh Rukmini dengan satuan ug/ml (Rukmini *et al .*, 2004). Prosedur lengkapnya dapat dilihat pada lampiran 3.

4. Aktivitas SOD eritrosit

Aktivitas SOD eritrosit ditentukan dengan metode Wong (1989) yang modifikasi oleh Karabulut (Karabulut *et al.*, 2002) dengan satuan uU/eritrosit. Prosedur lengkapnya dapat dilihat pada lampiran 4.

4.4 Bahan Penelitian

4.4.1 Hewan coba

Penelitian ini menggunakan *Rattus norvegicus strain Wistar* jenis kelamin jantan dewasa yang berumur 2,5-3 bulan, berat badan 150-250 gram dengan kondisi sehat dari Laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

4.4.2 Ekstrak jinten hitam

Jinten hitam diperoleh dari Balai Materia Medika Batu Malang. Untuk membuat ekstrak jinten hitam diperlukan biji jinten hitam sebanyak 1 kg dan etanol sebanyak 5 liter. Cara pembuatan ekstrak jinten hitam dapat dilihat pada lampiran 2.

4.4.3 Darah

Darah diambil dari ventrikel tikus menggunakan spuit 5 ml yang sudah diberi antikoagulan Na sitrat.

4.5 Instrumen Penelitian

Pada penelitian ini diperlukan alat-alat sebagai berikut :

- a. Alat timbang berat badan tikus.
- b. Sonde .
- c. Alat untuk perlakuan renang meliputi beban dari logam, stopwatch dan timba besar dengan diameter 40 cm dan tinggi 55 cm.

- d. Alat untuk mengambil *whole blood* yaitu gunting, pinset *chirurgis* dan spuit 5 ml
- e. Alat untuk pemeriksaan MDA dan SOD meliputi tabung reaksi, *ependorf*, *waterbath*, *microsentrifuge*, *vortex*, *transpipe*, *spektrofotometer*, *glass wool*.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Persiapan hewan coba

Seluruh hewan coba dikondisikan dengan laboratorium/lingkungan dan pakan selama 7 hari, sambil diamati kondisi kesehatannya. Pakan menggunakan Par G dari PT Comfeed dan minum aqua. Kandang terbuat dari plastik (40x30x20)cm, ditutup dengan anyaman kawat serta beralaskan sekam. Sekam diganti setiap dua hari sekali (Ingle, 1962).

4.6.2 Pembagian kelompok hewan coba

Dilakukan randomisasi terhadap 40 ekor tikus yang sudah disiapkan, diambil 30 ekor dan dibagi menjadi 5 kelompok yaitu :

- 1. Kelompok K0 : diberi aquadest per sonde selama 5 hari sebagai kontrol
- 2. Kelompok K1 : diberi aquadest per sonde selama 5 hari, 1 jam setelah pemberian terakhir dilakukan latihan renang.

3. Kelompok K2 : diberi ekstrak jinten hitam 1 ml/kgBB/h per sonde, selama 5 hari. 1 jam setelah pemberian terakhir dilakukan latihan renang.
4. Kelompok K3 : diberi ekstrak jinten hitam 2 ml/kgBB/h per sonde, selama 5 hari. 1 jam setelah pemberian terakhir dilakukan latihan renang.
5. Kelompok K4 : diberi ekstrak jinten hitam 4 ml/kgBB/h per sonde, selama 5 hari. 1 jam setelah pemberian terakhir dilakukan latihan renang.

4.6.3 Pemberian ekstrak jinten hitam

Jinten hitam diberikan setiap hari, selama 5 hari, dengan dosis 1, 2 dan 4 ml/kgBB. Pemberian yang terakhir diberikan 1 jam sebelum latihan olahraga anaerobik.

4.6.4 Latihan olahraga anaerobik

Latihan olahraga anaerobik dilakukan dengan merenangkan tikus, dengan memberi beban 9% BB, diikatkan 5 cm dari ujung ekor tikus (Yunus, 2001). Latihan dilakukan 1 jam setelah pemberian jinten hitam yang terakhir (hari kelima) selama 80% dari waktu renang maksimal (Fox, 1998; Yunus 2001). Waktu renang maksimal diperoleh melalui penelitian pendahuluan, dengan cara merenangkan 10 ekor tikus yang diberi beban 9% dari berat badan tikus (periksa lampiran 5). Waktu tikus mulai berenang sampai tenggelam, disebut waktu renang maksimal. Tikus dianggap

tenggelam jika dirangsang 3 kali secara mekanik (menekan pantatnya) tidak memberikan gerakan berenang (Maslachah, 2001). Renang dilakukan 3 set, dengan durasi total 168 detik. Waktu istirahat antar set 5 menit, dengan tujuan sistem fosfagen sudah mengalami pulih asal maksimal (Fox, 1998; Soekarman, 1989).

4.6.5 Prosedur pengambilan darah

Pada hari terakhir setelah mendapat perlakuan, seluruh hewan coba dianestesi dengan eter dan dilakukan pembedahan serta diambil darahnya melalui ventrikel jantung menggunakan spuit 5 ml yang sudah diberi Na sitrat. Dari sampel darah tersebut diambil 0,5 ml untuk pemeriksaan aktivitas SOD eritrosit, 0,5 ml untuk pemeriksaan jumlah eritrosit dan 0,5 ml untuk pemeriksaan PCV. Sisa darah digunakan untuk pemeriksaan MDA plasma.

4.6.5.1 Kadar MDA plasma

Kadar MDA plasma ditentukan dengan menggunakan metode TBARS dari Flower, 1973. Prinsip metode ini adalah dengan mereaksikan MDA dengan TBA pada suasana asam (pH 2-3) dan temperatur 97-100°C, membentuk warna pink (Rukmini *et al.*, 2004). perubahan warna ini diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 531,6 nm (periksa lampiran 3).

4.6.5.2 Aktivitas SOD eritrosit

Aktivitas SOD eritrosit diukur dengan metode Wong (1989) dan satuan uU/eritrosit. Prinsip metode ini, adalah dengan mengukur kadar formazan (berwarna

merah), yang merupakan hasil reduksi NBT (*nitro blue tetrazolium*) oleh ion superoksida. Ion superoksida dibentuk dengan mereaksikan santin dan santin oksidase. Satu unit aktivitas SOD menunjukkan sejumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghambat reduksi NBT menjadi 50% dalam kondisi tertentu (Rukmini *et al.*, 2004) Perubahan warna yang terjadi kemudian diamati dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm (periksa lampiran 4).

4.6.5.3 Jumlah eritrosit

Darah dihisap dengan pipet eritrosit sampai tanda 0,5 dan ditambahkan reagen Hayem sampai garis. Didiamkan selama 10 menit selanjutnya dibaca dalam kamar hitung eritrosit.

4.6.5.4 PCV (Hematokrit)

Tabung hematokrit diisi darah sampai angka 10, disentrifugasi dengan kecepatan 11.500-15.000 rpm selama 10 menit, kemudian dilakukan pembacaan hasil

4.7 Lokasi dan Jadwal Penelitian

4.7.1 Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.7.2 Jadwal penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 10 bulan, mulai pada bulan Oktober 2004 sampai dengan Juli 2005, jadwal penelitian dapat dilihat pada tabel berikut :

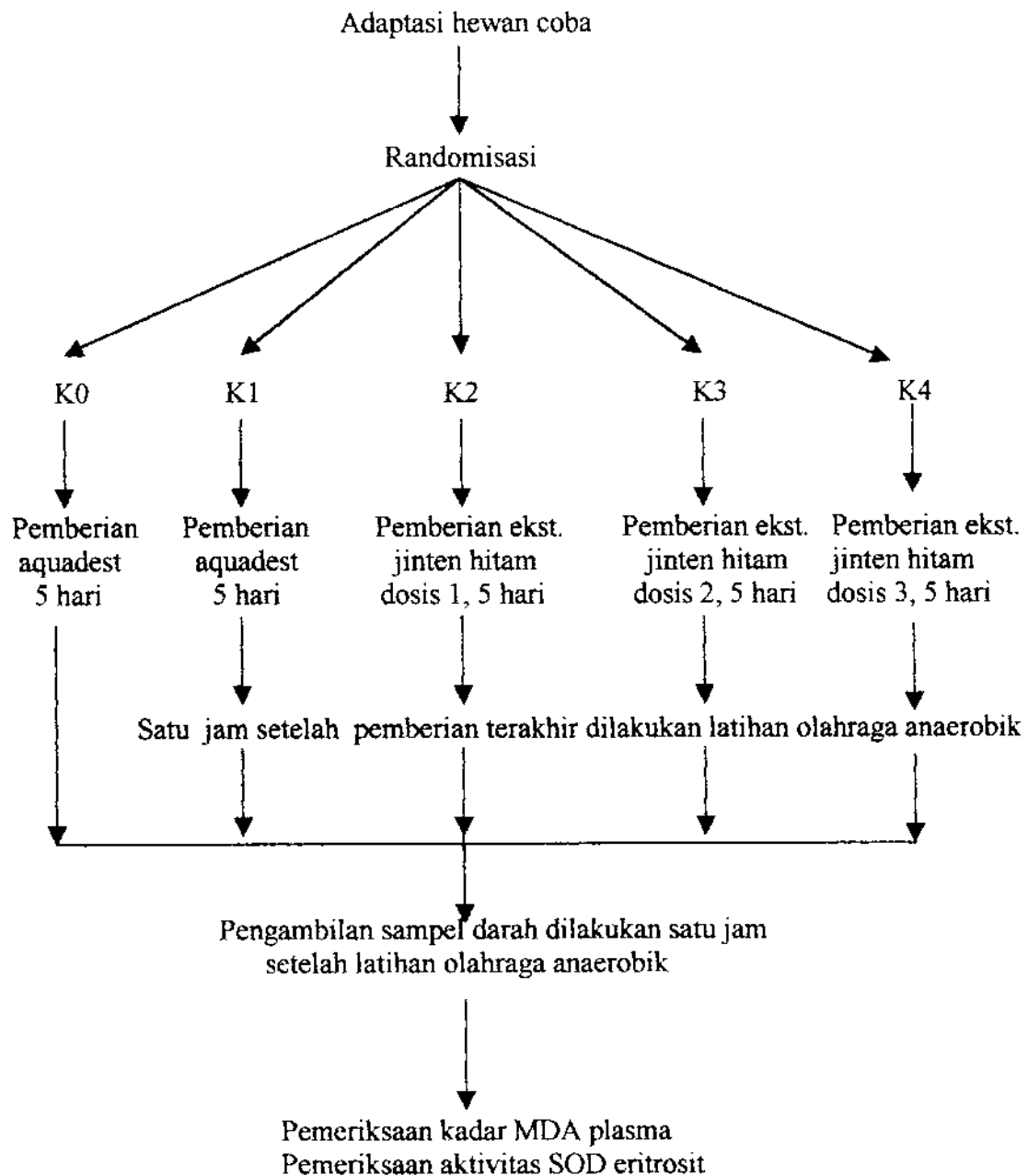
Bulan ke- Uraian	I	II	III	IV	V	VI	VII	VII	IX	X
Studi pustaka										
Pembuatan proposal										
Penelitian pendahuluan										
Perlakuan										
Pengumpulan data										
Analisis data										
Pembuatan laporan										

4.8 Analisis Data

Data yang didapat dari pemeriksaan kadar MDA plasma dan aktivitas SOD eritrosit tikus putih dianalisis dengan uji *multiple analysis of varians* (MANOVA). Derajat kepercayaan (*confident interval*) 95%, jika terdapat perbedaan diantara kelompok perlakuan, dilanjutkan dengan uji LSD.

4.9 Kerangka Operasional

Kerangka operasional penelitian secara ringkas dapat dilihat pada bagan berikut ini :



BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

Data yang didapat dari hasil penelitian berupa kadar MDA plasma dan aktivitas SOD eritrosit, selanjutnya dideskripsikan dan diuji dengan MANOVA, taraf signifikansi 5% dan di olah dengan program SPSS versi 11.5

5.1 Hasil Uji Statistik Deskriptif

Data penelitian mencakup data variabel tergantung, data tersebut dianalisis secara statistik deskriptif yang bertujuan untuk memperoleh gambaran distribusi dan peringkasan data guna penyajian hasil hingga mendapatkan kejelasan. Rata-rata kadar MDA plasma dan aktivitas SOD eritrosit untuk tiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel 5.1

Tabel 5.1 Rata-rata Kadar MDA Plasma dan Aktivitas SOD eritrosit.

Variabel Tergantung	Perlakuan				
	K0	K1	K2	K3	K4
MDA (ug/ml)	0.5155±0.10	1.0570±0.29	0.9090±0.25	0.7467±0.17	0.4717±0.17
SOD (uU/eri)	0.1030±0.01	0.0567±0.01	0.0639±0.01	0.0743±0.01	0.0956±0.01

Dari tabel 5.1 dapat dilihat bahwa pada kelompok yang diberi perlakuan latihan olahraga anaerobik tanpa diberi jinten hitam (K1) terjadi peningkatan kadar MDA plasma (1.0570±0.29) dan penurunan aktivitas SOD eritrosit (0.0567±0.01)

dibandingkan dengan kontrol (K0) (0.5155 ± 0.10 dan 0.1030 ± 0.01). Pada K2, K3 dan K4 yaitu kelompok yang diberi jinten hitam sebelum latihan olahraga anaerobik dengan dosis masing-masing 1, 2, 4 ml/kgBB terjadi penurunan kadar MDA plasma dan peningkatan aktivitas SOD eritrosit dibandingkan dengan K1. Pada K4 terjadi penurunan kadar MDA plasma sehingga lebih rendah dari K0 (0.4717 ± 0.17), sedangkan aktivitas SOD eritrositnya meningkat mendekati K0 (0.0956 ± 0.01).

5.2 Hasil Uji Normalitas

Sebagai persyaratan sebelum di uji dengan Manova, data diuji dengan normalitas distribusinya dengan uji Kolmogorov-Smirnov seperti pada tabel dibawah ini

Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas

Variabel	K-S Z	Sig
Kadar MDA plasma	0.804	0.538
Aktivitas SOD eritrosit	0.681	0.743

Dari tabel 5.2 diatas dapat dilihat bahwa untuk kadar MDA plasma didapatkan $p=0.538$ dan aktivitas SOD eritrosit $p=0.743$. Hal ini berarti bahwa untuk kedua variabel $p>0.05$ yang berarti bahwa data untuk kedua variabel mempunyai distribusi yang normal.

5.3 Hasil Uji Homogenitas

Setelah dilakukan uji normalitas, tahap selanjutnya dilakukan uji homogenitas seperti pada tabel 5.3 di bawah ini:

Tabel 5.3 Hasil Uji Homogenitas (Uji Lavene)

Variabel	F	P
Kadar MDA Plasma	2.337	0.087
Aktivitas SOD eritrosit	0.179	0.947

Dari uji homogenitas seperti tabel 5.3 diatas didapatkan $p=0.087$ untuk kadar MDA plasma dan $p=0.947$ untuk aktivitas SOD eritrosit. Untuk kedua variabel $p>0.05$, hal ini berarti bahwa kedua variabel mempunyai varians yang homogen untuk tiap-tiap kelompok perlakuan, sehingga memenuhi syarat untuk dilakukan uji MANOVA.

5.4 Hasil Uji MANOVA

Uji MANOVA digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan kadar MDA plasma dan aktivitas SOD eritrosit pada masing-masing kelompok perlakuan secara terpisah maupun secara bersama-sama.

Hasil uji MANOVA menunjukkan bahwa terdapat minimal satu kelompok yang berbeda bermakna dari kelima kelompok perlakuan untuk MDA dan SOD ($p=0.00$) seperti terlihat pada tabel berikut ini:

Tabel 5.4 Hasil Uji MANOVA

	Nilai	F	Sig
Wilks' Lambda	0.144	8.586	0.00

Untuk mengetahui variabel mana yang menunjukkan perbedaan bermakna dilakukan uji ANOVA.

5.5 Hasil Uji ANOVA

Uji ANOVA dilakukan untuk mengetahui variabel mana yang menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan. Uji ANOVA dilakukan untuk masing-masing variabel. Hasil uji ANOVA untuk kadar MDA plasma dan aktivitas SOD eritrosit dapat dilihat pada tabel 5.5

Tabel 5.5 Hasil Uji ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
MDA	Between Groups	1.378	4	.344	8.301	.000
	Within Groups	.913	22	.041		
	Total	2.291	26			
SOD	Between Groups	.009	4	.002	13.402	.000
	Within Groups	.004	22	.000		
	Total	.012	26			

Hipotesis pada penelitian ini dapat dinyatakan dengan hipotesis nol (H_0) untuk kadar MDA plasma "tidak ada perbedaan kadar MDA plasma antara kelompok perlakuan" dan hipotesis alternatif (H_a/H_1) "minimal terdapat satu kelompok yang

mempunyai kadar MDA plasma berbeda bermakna antara kelompok perlakuan”, sedangkan H_0 untuk aktivitas SOD eritrosit “tidak ada perbedaan aktivitas SOD eritrosit antara kelompok perlakuan” dan H_1 “minimal terdapat satu kelompok yang mempunyai aktivitas SOD eritrosit berbeda bermakna antara kelompok perlakuan”

Dari uji ANOVA seperti pada tabel 5.5 diatas didapatkan untuk kadar MDA plasma $p=0.000$. Hal ini berarti H_0 ditolak dan H_1 diterima, sehingga untuk kadar MDA plasma minimal terdapat satu kelompok yang berbeda bermakna. Dari uji ANOVA juga didapatkan untuk aktivitas SOD eritrosit $p=0.000$ yang berarti H_0 ditolak dan H_1 diterima, sehingga untuk aktivitas SOD eritrosit minimal terdapat satu kelompok yang berbeda bermakna.

5.6 Hasil Uji LSD

Dari uji ANOVA diketahui bahwa untuk kedua variabel masing-masing terdapat minimal satu kelompok yang berbeda bermakna. Untuk mengetahui antara kelompok mana yang menunjukkan perbedaan bermakna dilakukan uji LSD seperti pada tabel 5.6.. Dari tabel 5.6 dapat dilihat bahwa untuk kadar MDA plasma antara K_0 dengan K_1 dan K_2 terdapat perbedaan bermakna ($p<0.05$), sedangkan K_0 dengan K_3 dan K_4 berbeda tidak bermakna ($p>0.05$). K_1 dan K_2 berbeda tidak bermakna ($p>0.05$), sedangkan K_1 dengan K_3 dan K_4 berbeda bermakna ($p<0.05$). K_2 dan K_3 berbeda tidak bermakna sedangkan K_2 dengan K_4 berbeda tidak bermakna. K_3 dengan K_4 berbeda tidak bermakna. Aktivitas SOD eritrosit antara K_0 dengan K_1 , K_2 dan K_3 berbeda bermakna sedangkan K_0 dengan K_4 berbeda tidak bermakna. K_1 dengan K_2 dan K_3 berbeda tidak bermakna sedangkan K_1 dengan K_4 berbeda

bermakna. K2 dengan K3 berbeda tidak bermakna sedangkan K2 dengan K4 berbeda bermakna. K3 dengan K4 berbeda bermakna.

Dari uji LSD dapat diketahui bahwa pemberian perlakuan latihan olahraga anaerobik tanpa diberi jinten hitam menyebabkan peningkatan kadar MDA plasma dan penurunan aktivitas SOD eritrosit secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pemberian ekstrak jinten hitam sebelum latihan dengan dosis 1, 2 dan 4 ml/kgBB/h selama 5 hari ternyata dapat mencegah peningkatan kadar MDA plasma dan penurunan aktivitas SOD eritrosit. Pada dosis 1 ml/kgBB/h efek pencegahan yang terjadi tidak bermakna sedangkan dosis 2 dan 4 ml/kgBB/h bermakna. Dosis 4ml/kgBB/h lebih efektif dari pada 2ml/kgBB/h, bahkan dosis tersebut dapat mencegah peningkatan kadar MDA plasma dan penurunan aktivitas SOD eritrosit sehingga tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol.

Tabel 5.6 Hasil Uji LSD

Variabel tergantung	(I) PLK	(J) PLK	Sig
MDA	0	1	.000
		2	.004
		3	.086
		4	.737
	1	0	.000
		2	.221
		3	.020
		4	.000
	2	0	.004
		1	.221
		3	.202
		4	.002
	3	0	.086
		1	.020
		2	.202
		4	.044
	4	0	.737
		1	.000
		2	.002
		3	.044
SOD	0	1	.000
		2	.000
		3	.002
		4	.367
	1	0	.000
		2	.336
		3	.188
		4	.000
	2	0	.000
		1	.336
		3	.188
		4	.000
	3	0	.022
		1	.032
		2	.188
		4	.015
	4	0	.367
		1	.000
		2	.000
		3	.015

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Metode

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak jinten hitam terhadap stres oksidatif pada tikus putih yang diberi perlakuan latihan olahraga anaerobik. Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental laboratories* karena memenuhi persyaratan adanya intervensi (perlakuan), replikasi randomisasi dan adanya kontrol (Zainuddin, 2000).

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *the post test only control group design*. Rancangan ini dipilih dengan pertimbangan :

1. variabel bebasnya dapat dikendalikan
2. mudah dilaksanakan
3. dapat diuji secara statistik
4. penelitian eksperimental merupakan salah satu metode penelitian yang tepat untuk mengetahui hubungan sebab akibat.

Sampel pada penelitian ini adalah tikus putih jantan, berumur sekitar 3 bulan, dengan berat badan kurang lebih 200 gram, dengan pertimbangan bahwa hewan ini mudah didapatkan, mudah beradaptasi sesuai dengan lingkungan yang baru serta cukup mudah untuk di manipulasi sehingga jumlah sampel dapat dikendalikan dengan baik. Dipilih kelamin jantan karena tidak mengalami siklus hormonal yang dapat mempengaruhi hasil penelitian. Pemilihan umur 3 bulan didasarkan pada

pertimbangan sudah mencapai umur dewasa, sedangkan berat badan dapat menggambarkan kesehatan hewan coba (Ingle, 1962; Wattimena *et al.*, 1993)

Perlakuan yang diberikan pada hewan coba dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak jinten hitam dengan dosis 1, 2 dan 4 ml/kgBB/hari, selama 5 hari per sonde. Pemilihan dosis didasarkan pada penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa efek ekstrak jinten hitam tampak pada dosis 0,6 (Zaoui *et al.*, 2000), 1 (Zaoui *et al.*, 2002) 2,5 dan 5 ml/kgBB (Mahmoud *et al.*, 2002). Diberikan selama 5 hari dengan pertimbangan bahan aktif utama pada jinten hitam yaitu thymoquinon, memberikan efek yang nyata setelah diberikan 5 hari (Mansour *et al.*, 2002). Pemberian terakhir diberikan 1 jam sebelum latihan. Hal ini dilakukan karena bahan aktif jinten hitam membutuhkan waktu sekitar 1 jam untuk mencapai kadar puncak plasma pada tikus putih (Zaoui *et al.*, 2002).

Latihan olahraga pada penelitian ini hanya dilakukan satu kali atau dikenal dengan latihan olahraga akut (*physical exercise*) untuk menghindari adanya adaptasi pada hewan coba. Latihan olahraga yang dilakukan berulang kali (*physical training*) dapat meningkatkan aktivitas antioksidan termasuk SOD (Aslan *et al.*, 1998; Chevion *et al.*, 2003). Latihan olahraga anaerobik menggunakan modus renang dengan pertimbangan mudah, praktis dalam pelaksanaannya, alamiah dalam gerakannya dan aktivitas sesuai dengan tujuan yang diharapkan (Harjanto & Santoso, 2001; Yunus, 2001). Beban latihan olahraga anaerobik dalam penelitian ini adalah 9% dari berat badan tikus (Yunus, 2001) diberikan dengan intensitas 80% dari kemampuan maksimal atau yang dikenal dengan intensitas submaksimal, yang menghasilkan keadaan anaerobik (Fox *et al.*, 1998).

Pengambilan sampel darah dilakukan dengan aspirasi secara langsung melalui ventrikel jantung agar bisa mendapatkan darah yang cukup. Pengambilan darah dilakukan 1 jam pasca latihan dengan pertimbangan kadar MDA plasma sudah cukup tinggi (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001) dan aktivitas SOD masih rendah, menurun sekitar 26% (Patellongi, 1991).

6.2 Pembahasan Hasil Penelitian

Pembahasan hasil penelitian ini merupakan penafsiran lebih lanjut dari fakta yang diperoleh dan dianalisis pada BAB 5. Pembahasan ini dimaksudkan untuk menjawab permasalahan sehingga tujuan penelitian dapat dicapai. Pemeriksaan kadar MDA plasma disertai dengan pemeriksaan PCV (hematokrit) untuk menghindari adanya bias hasil pemeriksaan karena terjadi hemokonsentrasi pasca latihan. Pada penelitian ini didapatkan angka PCV pasca latihan tidak ada yang melebihi rata-rata+2SD kelompok kontrol, sehingga tidak perlu dilakukan konversi (Harjanto & Santoso, 2001). Aktivitas SOD eritrosit dinyatakan dalam uU/eritrosit, didapat dengan cara membagi hasil pemeriksaan (dalam uU/mm³) dengan jumlah eritrosit/mm³ darah. Hal ini dilakukan untuk mencegah adanya bias karena adanya eritolisis akibat latihan olahraga (Enturk *et al.*, 2001; Yunus, 2001). Dari rangkaian kegiatan penelitian yang dimulai dari pengumpulan data dan dilanjutkan dengan analisis statistik, diperoleh hasil penelitian sebagai berikut

6.2.1 Uji statistik Deskriptif

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa pemberian latihan olahraga anaerobik menyebabkan rata-rata kadar MDA plasma meningkat dibandingkan kelompok kontrol. Hasil ini sesuai dengan penelitian Yunus (2001) dan Chevion *et al.* (2003). Pemberian ekstrak jinten hitam dengan dosis 1, 2 dan 4 ml/kgBB/h selama 5 hari pada tikus sebelum diberi perlakuan latihan olahraga anaerobik ternyata dapat mencegah kenaikan kadar MDA plasma, sehingga kadarnya lebih rendah dibanding kelompok tikus yang diberi perlakuan latihan olahraga anaerobik saja.

Penelitian ini juga menghasilkan fakta bahwa latihan olahraga anaerobik ternyata dapat menurunkan aktivitas SOD eritrosit dibanding kelompok kontrol. Hasil ini sesuai dengan penelitian Aslan *et al* (1998) dan Patellongi (1999). Pemberian ekstrak jinten hitam dengan dosis dosis 1, 2 dan 4 ml/kgBB/h selama 5 hari sebelum diberi perlakuan latihan olahraga anaerobik ternyata dapat mencegah penurunan aktivitas SOD, ditunjukkan dengan peningkatan aktivitas SOD eritrosit dibanding dengan kelompok tikus yang diberi perlakuan latihan olahraga anaerobik saja.

6.2.2 Uji Normalitas

Uji normalitas ini dilakukan untuk mengetahui apakah variabel-variabel yang diuji tersebut berdistribusi normal. Salah satu syarat dilakukan uji MANOVA adalah datanya harus berdistribusi normal. Uji normalitas ini dilakukan terhadap variabel tergantung yaitu kadar MDA plasma dan aktivitas SOD eritrosit. Dari uji normalitas

(Kolmogorov-Smirnov) dapat diambil kesimpulan bahwa distribusi datanya normal ($p=0,538$) untuk MDA dan ($p=0,743$) untuk SOD.

6.2.3 Uji Homogenitas

Untuk mengetahui bahwa variabel tergantung mempunyai varians yang sama untuk masing-masing kelompok perlakuan, dilakukan uji homogenitas. Hasil uji homogenitas untuk kadar MDA plasma $p=0,87$ dan aktivitas SOD eritrosit $p=0,947$, yang berarti kedua variabel mempunyai varians yang homogen ($p>0,05$) dan memenuhi syarat untuk dilanjutkan dengan uji MANOVA

6.2.4 Uji MANOVA dan LSD

Hasil uji MANOVA menunjukkan bahwa minimal terdapat satu kelompok yang berbeda sangat bermakna antara kelima kelompok perlakuan ($p=0,00$). Untuk mengetahui antara kelompok mana yang berbeda dilakukan uji LSD.

Dari uji LSD didapatkan bahwa kelompok yang diberi perlakuan latihan olahraga anaerobik mempunyai kadar MDA plasma yang lebih tinggi, berbeda sangat bermakna dengan kelompok kontrol ($p=0,00$). Hasil ini sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Yunus, 2001 dan Chevion *et al.*, 2003. Keadaan ini terjadi karena latihan olahraga menyebabkan peningkatan metabolisme (Aslan *et al.*, 1998) dan konsumsi oksigen (Ji, 1999) yang dapat meningkatkan produksi ROS (Chevion *et al.*, 2003). Makin berat latihan olahraga yang dilakukan makin banyak ROS yang terbentuk dan makin banyak pula ROS yang gagal dinetralisir (Sjodin, 1990). ROS yang tidak dinetralisir akan bereaksi dengan komponen-komponen tubuh diantaranya

PUFA, sehingga menyebabkan peroksidasi lipid yang menghasilkan berbagai senyawa toksik antara lain MDA (Suryohudoyo, 2000).

Aktivitas SOD eritrosit pada kelompok yang diberi perlakuan latihan olahraga anaerobik menurun, berbeda sangat bermakna dengan kelompok kontrol ($p=0,00$). Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Aslan *et al.*, 1998 dan Patellongi, 1999. Hal ini bisa terjadi karena peningkatan ROS pada latihan olahraga anaerobik, khususnya $\bullet O_2^-$ menyebabkan makin banyak antioksidan khususnya SOD untuk menetralsirnya. Dengan kata lain makin banyak SOD yang digunakan sehingga kadar SOD menurun (Patellongi, 1999).

Sumber energi olahraga anaerobik diantaranya adalah *lactic system* yang menghasilkan asam laktat. Makin tinggi intensitas latihan makin tinggi pula asam laktat yang dihasilkan sehingga menyebabkan akumulasi asam laktat (Soekarman, 1989). Disamping dapat merubah ROS menjadi lebih reaktif (Demopoulus, 1994) asam laktat dapat mengganggu kerja beberapa enzim (Murray *et al.*, 2001) bahkan dapat merusaknya, termasuk SOD (Halliwell & Gutteridge, 1999), sehingga asam laktat dapat menurunkan kadar SOD (Patellongi, 1999).

Oksidan yang meningkat dan tidak ternetralsir akan menyerang berbagai komponen tubuh termasuk protein (Suryohudoyo, 2005). SOD merupakan suatu protein sehingga juga menjadi sasaran serangan oksidan. Serangan tersebut dapat menyebabkan kerusakan dan gangguan fungsi/aktivitas SOD.

SOD pada eritrosit sebagian besar adalah CuZnSOD (Halliwell & Gutteridge, 1999). CuZnSOD aktivitasnya lebih mudah dihambat oleh oksidan terutama H_2O_2 , dengan cara mereduksi Cu^{++} menjadi Cu^+ (Aslan *et al.*, 1998). Cu^{++} pada CuZnSOD

mempunyai peranan fungsi katalitik, sehingga reduksi pada Cu^{++} menyebabkan fungsi katalitik CuZnSOD terganggu. (Halliwell & Gutteridge, 1999). Eritrosit tidak mengandung inti sel sehingga tidak dapat mensintesis protein. Kerusakan SOD eritrosit tidak diimbangi dengan sintesis SOD yang baru, akibatnya kadar atau aktivitas SOD eritrosit menurun (Aslan *et al.*, 1998).

Pemberian ekstrak jinten hitam 1 ml/kgBB/h selama 5 hari, sebelum latihan olahraga anaerobik, menyebabkan kadar MDA plasma menurun dibandingkan kelompok yang diberi perlakuan latihan olahraga anaerobik tanpa diberi ekstrak jinten hitam, tetapi penurunan ini tidak bermakna ($p=0,221$), sedangkan aktivitas SOD eritrositnya meningkat tidak bermakna ($p=0,336$). Hal ini berarti pemberian ekstrak jinten hitam 1 ml/kgBB/h selama 5 hari tidak dapat mencegah stres oksidatif akibat latihan olahraga anaerobik secara bermakna.

Pemberian ekstrak jinten hitam 2 dan 4 ml/kgBB/h sebelum latihan olahraga anaerobik menyebabkan penurunan kadar MDA plasma yang bermakna ($p=0,02$) dan ($p=0,00$) dibandingkan kelompok yang diberi perlakuan latihan olahraga anaerobik tanpa diberi ekstrak jinten hitam, sedangkan aktivitas SOD eritrositnya mengalami peningkatan yang bermakna ($p=0,032$) dan ($p=0,00$). Kenyataan ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak jinten hitam 2 dan 4 ml/kgBB/h selama 5 hari dapat mencegah terjadinya stres oksidatif akibat latihan olahraga anaerobik secara bermakna.

Latihan olahraga anaerobik menyebabkan stres oksidatif yang ditandai dengan peningkatan kadar MDA plasma dan penurunan aktivitas SOD eritrosit. Pemberian ekstrak jinten hitam 2 dan 4 ml/kgBB/h, ternyata dapat meredam dampak negatif

peningkatan oksidan akibat latihan olahraga anaerobik, sehingga ekstrak jinten hitam dapat dikatakan mempunyai aktivitas antioksidan (Buris & Bucor, 2000).

Pemberian ekstrak jinten hitam 4 ml/kgBB/h ternyata menghasilkan efek protektif terhadap stres oksidatif yang lebih baik dibandingkan dengan pemberian ekstrak jinten hitam 2 ml/kgBB/h. Hal ini ditunjukkan dengan kadar MDA plasma yang lebih rendah secara bermakna ($p=0,044$) dan aktivitas SOD eritrosit yang lebih besar secara bermakna ($p=0,015$). Kenyataan ini terjadi karena konsentrasi antioksidan yang diberikan lebih besar, sehingga efek protektifnya juga lebih besar.

Pada penelitian ini juga didapatkan fakta bahwa pemberian ekstrak jinten hitam 4 ml/kgBB/h ternyata dapat mencegah peningkatan kadar MDA plasma dan aktivitas SOD eritrosit sehingga tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak jinten hitam 4 ml/kgBB/h selama 5 hari dapat mencegah terjadinya stres oksidatif akibat latihan olahraga anaerobik secara efektif, sehingga dapat disimpulkan dosis tersebut sebagai dosis yang efektif.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak jinten hitam dapat menghambat peningkatan kadar MDA plasma tikus putih yang mendapat perlakuan latihan olahraga anaerobik
2. Pemberian ekstrak jinten hitam dapat menghambat penurunan aktivitas SOD eritrosit tikus putih yang mendapat perlakuan latihan olahraga anaerobik
3. Pemberian ekstrak jinten hitam dengan dosis 4 ml/kgBB/h selama 5 hari dapat mencegah stres oksidatif akibat latihan olahraga anaerobik secara efektif

7.2 Saran

Walaupun penelitian ini dapat membuktikan bahwa ekstrak jinten hitam dapat menghambat terjadinya stres oksidatif, tetapi masih banyak permasalahan-permasalahan yang belum dapat dijawab melalui penelitian ini, sehingga diperlukan penelitian-penelitian lanjutan seperti :

1. penelitian yang mempelajari toksisitas dan efek samping ekstrak jinten hitam
2. penelitian yang mempelajari farmakokinetik jinten hitam
3. uji klinis pada manusia

Daftar Pustaka

- Alanko J, Asko R, Heikki V, 1992. Effect of catecholamines on eicosanoid synthesis with special reference to prostanoid/leukotrien (Review Article). *Free Radical Biology and Medicine* (13) : 677-688.
- Al-Awadi FM, Gumma KA, 1987. Studies on The activity of individual plants of an anti diabetic plant mixture. *Acta Diabetol Lat.* 24(1) : 37-41
- Al-Jishi SAA, 2000. A study of *N. sativa* on blood homeostatic function. Thesis. Damman, Saudi Arabia. King Abdul Azis University.
- Aslan Recep, Sekeroglu MR, Tarakcioglu M, Bayiroglu F, Meral I, 1998. Effect of acute and regular exercise on antioxidative enzymes, tissue damage markers and membran lipid peroxidation of erythrocytes in sedentary students. *Tr. J. of Medical Sciences* 28: 411-414.
- Astrand PO, Rodahl K, Dahl HA, 1986. Textbook of work physiology : Physiological Bases of Exercise 4^{ed}. Canada. McGraw-Hill. Pp. 238-270.
- Aqel M, Shaheen R, 1996. Effect of the oil of *N. sativa* seed on uterine smooth muscle of rat and guinea Pig.
- Badary OA, Al-Shabanah OA, Nagi MN, Al-Rikabi AC, Elmazar MN, 1999. Inhibition of benzo (a) pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice by thymoquinone. *Eur J Cancer Prev.* 8 (5): 435-40.
- Badary OA & Gamel EAM, 2001. Inhibitory effect of thymoquinone against 20-methylcholantrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis. *Cancer Detect Prev.* 25 (4) : 362-8.
- Bast A, Haenan GRMM, Doelman CJA, 1991. Oxidant antioxidant state of art. *The American Journal Medicine* [supl 3C] : 2-13.
- Bompa TO, 1994. Theory and methodology of training. 3rd ed. Iowa. Kendall/Hunt Pub. Comp. pp 13-56.
- Burits M, Bucar F, 2000. Antioxidant activity of *N. sativa* essential oil. *Abstract of Phytotherapy* 14 (5) : 323-328.
- Chevion S, Moran DS, Heled Y *et al.*, 2003. Plasma antioxidant stress and cell injury after severe physical exercise. *Proceedings of The United State of America.* 100 (9) : 5119-5123.

- Clarkson PM, 1995. Antioxidant and physical performance food science and nutrition. 35 (1&2) : 131-14.
- Clarkson PM & Thompson HS, 2000. Antioxidant: what role do they play in physical activity and health. American Journal of Clinical Nutrition 72 (2). 637s- 646s.
- Cochrane CG, 1991. Celluler injury by Oxidants. American Journal of Medicine 91 (3C) 23s-30s.
- Daba MH & Abdel Rahman MS, 1998. Hepatoprotective actifity of thymoquinone in isolates rates hepatocytes. Abstract of Toxicology Letter 95 (1) : 23-29.
- Demopoulus HB, 1994. Free radical pathology. Sport Health and Nutrition. Champaign : Human Kinetics Pub. pp 139
- El-Daly ES, 1998. Protective effect of cysteine and Vitamin . Crocus sativus and N. sativa Extracts on Cisplatin Induced Toxicity in Rats. J Pharm belg 53 (20) : 87-95.
- El Dakhakhany M, Barakat M, El-Halim MA, Aly SM, 2000. Effects of N. sativa oil in gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats. Abstracts of Journal Ethnopharmacology 72 (1-2) : 299-304.
- El Kadi A & Kandil O, 1986. Effect of N sativa on immunity. Proceeding of 4th International Conference Islamic Medicine. Kuwait. Bull Islamic Med. 4: 344-8.
- El Tahir KE, Al-Tahir AY, Agel AM, 1999. Pharmacological studies on sesame and N. sativa fixed Oil : Effects on The Sensitivities of The Adrenoceptors, Baroreceptors, Platelets and The Uterus of The Rat. Saudi Pharmaceutical J. 7 (4) : 205-15.
- Enturk UK, Ganduz F, Kuru O *et al.*, 2001. Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. J Appl physiol 91 (5): 1999-2004.
- Evan CR & Burkdorver KR, 1992. Free redical, lipoprotein and cardiovascular dysfunction. AJH. 2 (5) : 285-415.
- Flower RJ, 1973. quantitative determination of prostaglandin and malondialdehyde formed by arakhidonate oxygenase (prostaglandin synthase) system of bovine seminal vesicle. Prostaglandin. 4:325-40
- Fox EL, Bowers RW, and Foss MI, 1998. The physiological basis of physical education and athletics. 4th ed. Saunders Collage Pub. Philadelphia : pp 12-82.

- Ganong WF, 1999. Review of Medical Physiology. 19th ed. Appleton and Lange Standford Connecticut : pp 95-138.
- Golnick PD, 1986. Metabolic regulation in skeletal muscle : influence of endurance training exerted by mitochondrial protein concentration. *acta visiológica scandinavica*, 128 : 53-56.
- Halliwell B & Gutteridge JMC, 1999. Free Radical in Biology and Medicine, 3rd ed. Oxford University Press. Newyork. pp 301-495.
- Harjanto & Santoso KP, 2001. Penelitian pendahuluan tentang pengaruh intensitas dan durasi latihan renang pada tikus terhadap derajat stress oksidatif. *Majalah Ilmu Faal Indonewsia* 1(1): 13-21.
- Harjanto, 2003. Petanda biologis dan faktor yang mempengaruhi derajat stres oksidatif pada latihan olahraga aerobik sesaat. Disertasi. Surabaya. Program Pascasarjana. Universitas Airlangga.
- Harjanto, 2004. Pemulihan stres oksidatif pada latihan olahraga . *Jurnal Kedokteran YARSI* 12 (3) : 81-87.
- Harjanto, 2005. Peran ROS sebagai “second messenger”. Seminar IAIFI. Surabaya. hlm. 1-3
- Haq A, Abdullatif M, Lobo PI, Khabar KS, Sheth KV, Al-Sedairy ST, 1995. N. sativa.: Effect of human lymphocytes and polymorphonuclear leucocyte phagocytic activity. *Immunopharmacology* 30 (2) : 147-50.
- Hawkins CL, Davies MJ, 2001. Generation and propagation of radical reaction on proteins. *Biochem Biophysica Acta* 1504: 196-219.
- Higgins JE and Klinbaum, 1985. Design methodology of randomized trials. part II of the basic of randomized clinical trial within in emphasis of contraceptive research *Family Health International* 24-35.
- Honda Y & Honda S. The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mnsuperoxide dismutase gen expression in *Caenorhabditis elegans* . *The FASEB Journal* 13 : 1385-1393.
- Houghton PJ, Zarka R, De Las HB, Houlth JR, 1995. Fixed oil N. sativa and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation In leucocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med* Feb 61 (1) : 33-60.

- Ingle DJ, 1962. The use of the rat in the biologic assay of hormones. in: The rat in laboratory investigation second edition. Hafner Publishing Company. Newyork pp. 205-380.
- Isnandar W, 2003. Agribisnis toga sebagai upaya meningkatkan pendapatan dan kesehatan masyarakat. Seminar sehari Jamu Dayang Sumbi. Malang hlm :1-9.
- Ji Li Li, 1999. antioxidant and oxidative stress in exercise. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 222: 283-292.
- Karabulut AB, Sonmez E, Bayindir Y, Gokuzan E. 2002. A comparison of erythrocyte superoxide dismutase action in patients with hepatitis C infection. Turk J med Sci.32:313-316.
- Katch FI, 1984. Sport health and nutrition. human kinetics Publisher Inc. Campaign. Illionis : 140-167.
- Katzer Gernot, 2004. Spice pages : Nigella (onion seeds, falsely black cumin or black caraway. http://www.uni-graz.at/~katzer/engl_sat.html
- Lautan J, 1997. Radikal bebas pada eritrosit & leukosit. Cermin Dunia Kedokteran. 116, hlm 49-52.
- Leeuwenburgh C & Heinecke JW, 2001. Oxidative stress and antioxidant in exercise. Current Medical Chemistry 8 : 829-838.
- Lodish *et al.*, 1995. Molecular of Cell Biology, 3rd ed. Newyork : Scientific American Books Inc.
- Mahmoud MR, El-Abhar HS, Saleh S, 2002. The effect of N. sativa oil against the liver damage induced by Schistosoma mnsoni infection in mice. J Ethnopharmacol 79 (1) : 1-11.
- Mansour MA, Nagi MN, El-Khatib AS, Al-Bekhairi AM, 2002. Effect of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice : a possible mechanism of action. Cell Biochemistry and Function 20 (2) : 143-151.
- Maslachah L, 2001. Pengaruh antioksidan probucol terhadap kadar MDA dalam darah dan jumlah *circulating endotel* pada tikus putih yang menerima stresor. Tesis. Surabaya. Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, 2003. Biokimia Harper. Ed 25. Jakarta : EGC, hlm 178-205, 729-732.

- Nagi MN, Alam K, Badary OA, Al-Shabanah OA, Al-sawaf HA, Al- Bekairy AM, 1999. Thymoquinone protect against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. *Biochem Mol Biol Int* : 47 (1) : 153-9.
- Patellongi I, 1999. Pengaruh intensitas latihan fisik terhadap kerusakan jaringan. Ringkasan Disertasi. Surabaya. Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Rhandawa MA & Al-Gamdi MS, 2002. A Review of pharmacotherapeutic effects of *N. sativa*. *Pakistan J med. Res.* 41 (2).
- Rukmini MS, Benedicta D'Sauza, Vivian D'sauza, 2004. superoxide dismutase and catalase activities and their correlation with malondialdehyde in schizophrenic patients. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 19(2):114-116
- Sjodin B, Westing YH, Apple FS, 1990. Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. *Sport Medicine.* 10 (4): 236-254.
- Soekarman R, 1989. Dasar Olahraga untuk pembina, pelatih dan atlet. Jakarta. Haji Masagung. hlm. 21-60.
- Sudjarwo, 1995. Penentuan kondisi yang sesuai pada penentuan kadar MDA dengan metode spektrofotometrik. Seminar Nasional Himpunan Kimia Indonesia, Yogyakarta.
- Suryohudoyo Purnomo, 2000. Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler. Jakarta. Sagung Seto, hlm : 31-47.
- Suryohudoyo Purnomo, 2005. Oxidant and antioxidant defense in health and disease. Post Graduate Program Airlangga University in Collaboration with Institute of Biochemistry Humboldt University Berlin Germany. Surabaya. hlm. 1-17.
- Tjokroprawiro A & Sutjahjo A, 1995. Radikal Bebas dan Diabetes Simposium. Dampak negatif radikal bebas pada organ tubuh dan manfaat antioksidan. Surabaya, Hlm 1-22.
- Turkdogan MK, Agaoglu Z, Yener Z *et al.*, 2001. The role of antioxidant vitamins (C & E), selenium and *N. sativa* in rabbits : new hopes. *DTW Dtsch Tierarztl Wochenschr* 108 (2):71-3.
- Wagner H & Jurcic K, 1991. Assay for immunomodulation & effect on mediators of inflammation. *Methods in Plants Biochemistry* vol. 6 : Assay for Bioactivity. Academic Press. London : 195-217.
- Wattimena JR, Soegiarso NC, Soemardji AA, 1993. Petunjuk praktikum farmakologi. Laboratorium Farmakologi Jurusan farmasi FMIPA ITB. Bandung hal. 6-9.

- Wijaya A, 1996. Radikal bebas dan parameter status antioksidan. Forum Diagnosticum Prodia Diagnostics Educational Cervices. hlm 1-12.
- Williams GM, Jeffrey AM, 2000. Oxidative DNA damage : endogenous and chemistry induced. regulatory toxicology and pharmacology 32 : 283-292.
- Young IS, Woodside JV, 2001. Antioxidant in health and disease. J Clin Pathol 54: 176-186.
- Yunus M, 2001. Pengaruh vitamin C terhadap fragilitas & MDA eritrosit akibat latihan anaerobik. Tesis . Surabaya : Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.
- Zainuddin M, 2000. Metodologi Penelitian. Surabaya. Diktat Kuliah Program Pasca Sarjana universitas Airlangga.
- Zaoui A, Cherrah Y, Lacaille-Dubois MA, Settaf A, Amarouch H, Hassar M., 2000. Diuretic & hypotensive effects of *N. sativa* in the spontaneously hypotensive rat. Pub Med 55 (3) : 379-82.
- Zaoui A, Cherrah Y, Alaoui K, Mahassine N, Amarouch H, Hassar , 2002. Effect of *N. sativa* fixed oil on blood homeostasis in rat. J Ethnopharmacol 79 (1): 23-6.

Lampiran 1

Penentuan Besar Sampel

Berdasar rumus Higgins dan Kleinbaum (1985), maka besar sampel dapat ditentukan sebagai berikut :

$$n = \frac{1}{1 - f} \times \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \cdot Sc^2}{(X_c - X_t)^2}$$

dimana :

n = besar sampel

Z_{α} = nilai kesalahan (nilai kemaknaan) yang besarnya tergantung α .

Untuk $\alpha = 0,05$ maka $Z_{\alpha} = 1,96$.

Z_{β} = nilai kesalahan (nilai kemaknaan) yang besarnya tergantung β .

Untuk $\beta = 0,1$ maka $Z_{\beta} = 1,28$.

X_t = nilai rata-rata kelompok perlakuan

X_c = nilai rata-rata kelompok kontrol

Sc = simpangan baku kelompok kontrol

f = proporsi yang gagal

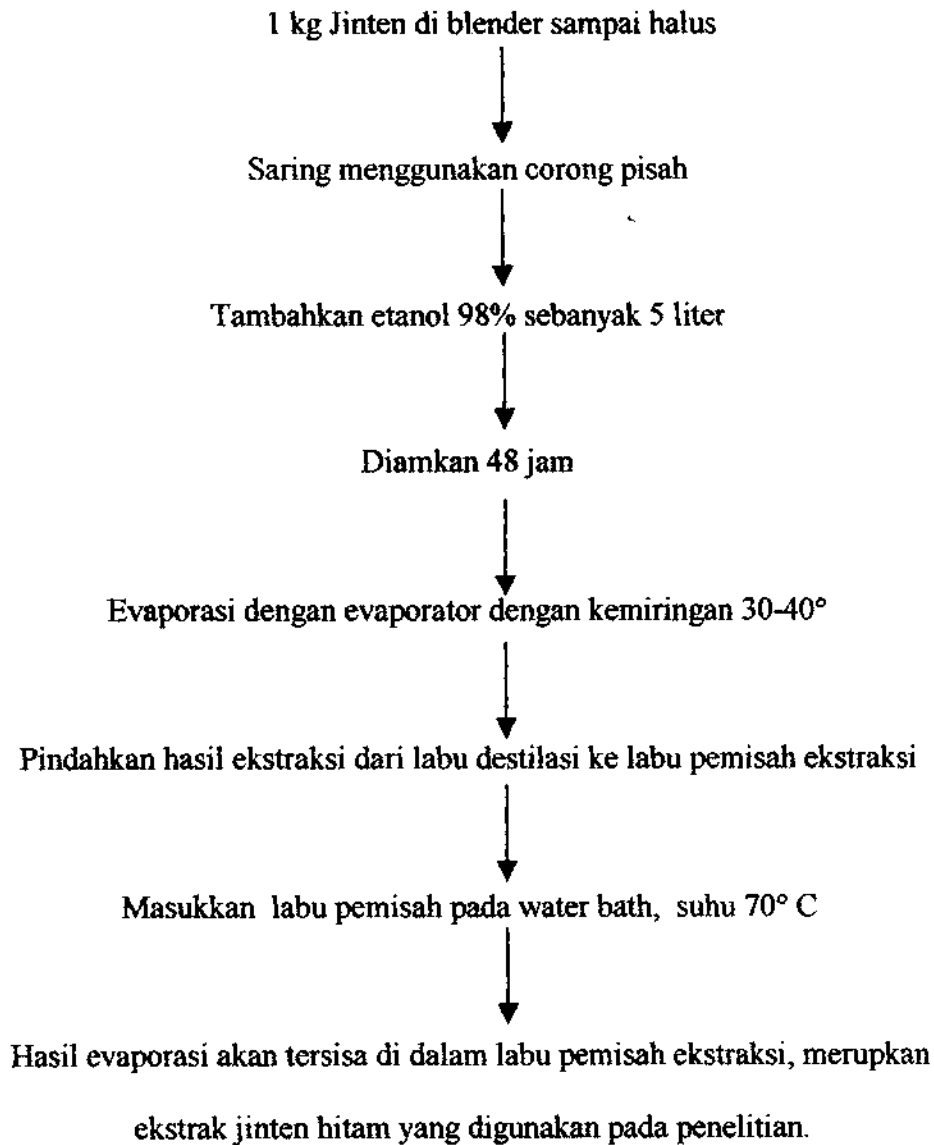
Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Maslachah, 2001, diperoleh data sebagai berikut:

$X_c = 2,618$; $Sc = 0,3$; $X_t = 1,866$. Untuk $f = 0$, maka $n = 3,34$. Jika $f = 0,3$ maka $n = 4,47$. Pada penelitian ini digunakan 6 ekor tikus tiap kelompok.

Lampiran 2

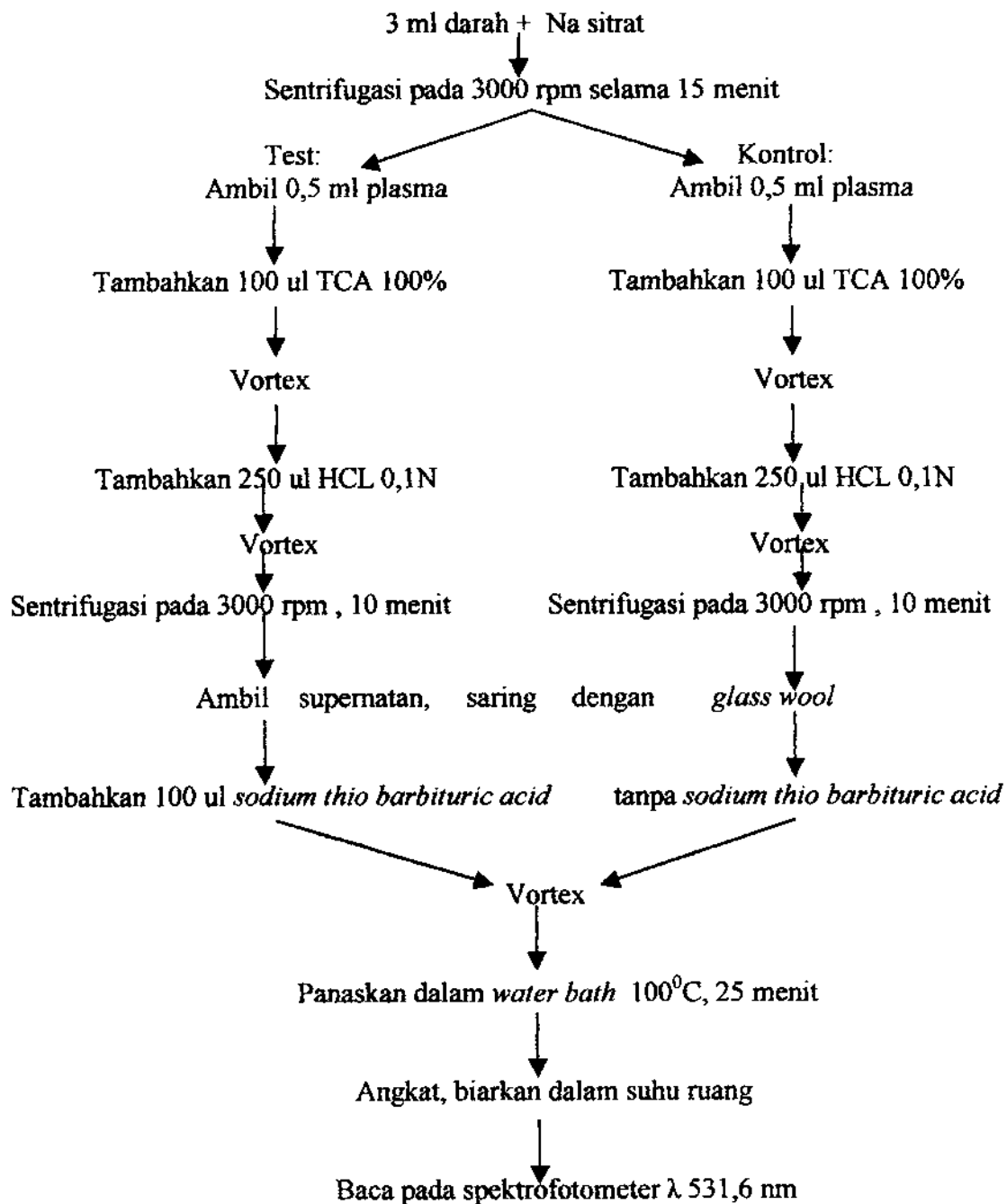
Pembuatan ekstrak jinten hitam

ekstrak jinten hitam dibuat dengan prosedur sebagai berikut :



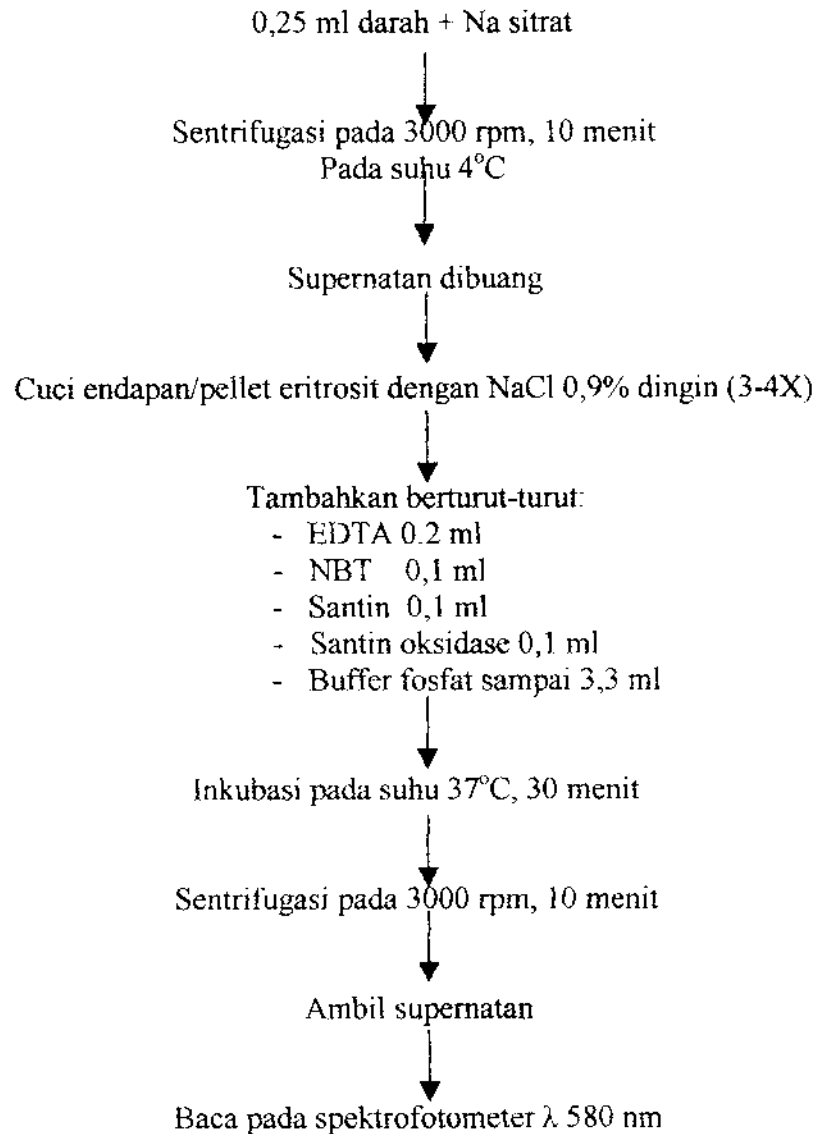
Lampiran 3

Cara kerja/prosedur pengukuran kadar MDA plasma adalah sebagai berikut :



Lampiran 4

Prosedur pengukuran aktivitas SOD eritrosit adalah sebagai berikut :



Lampiran 5

Hasil Penelitian Pendahuluan Kemampuan Renang Maksimal

No	Set 1 (detik)	Set 2 (detik)	Set 3 (detik)
1	109	53	30
2	120	60	41
3	113	57	37
4	116	58	33
5	110	53	36
6	118	63	37
7	113	57	34
8	107	51	31
9	121	67	40
10	118	69	40

Rata-rata:

- Set 1=114,5. 80% dari kemampuan renang maksimal= 91,6 detik
- Set 2=58,8. 80% dari kemampuan renang maksimal= 47 detik
- Set 3=35,9. 80% dari kemampuan renang maksimal= 28,72 detik



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Jalan Veteran Malang - 65145

Telepon : (0341) 551611 pes. 158 ; 569117, 567192 - Fax. (62) (0341) 564755 E-Mail : fkub-ina@indo.net.id

JAWA TIMUR - INDONESIA

Lab :

Jurusan :

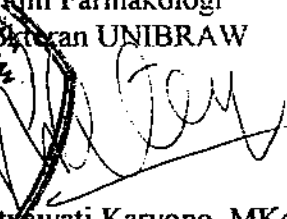
Kepada :
Yth. Dr. Khoiruddin
Pasca Sarjana UNAIR
Di tempat

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil pemeriksaan biokimiawi berupa SOD eritrosit dan MDA eritrosit yang telah dikerjakan di Laboratorium Farmakologi FK UNIBRAW.

Bersama ini pula kami sertakan perincian biaya untuk keperluan perawatan binatang termasuk makan, perlakuan sonde dan biaya untuk pemeriksaan tersebut.

Atas kerjasamanya diucapkan banyak terima kasih.

Kepala
Laboratorium Farmakologi
Fak. Kedokteran UNIBRAW

Dr. Setiawati Karyono, MKes
NIP. 130935073

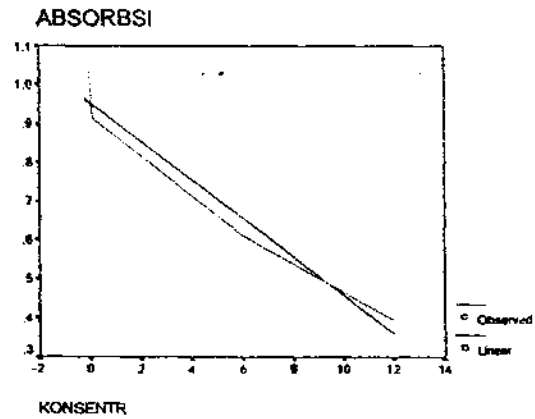
6/6-05

Lampiran :

1. Kurva baku SOD

Independent: KONSENTR

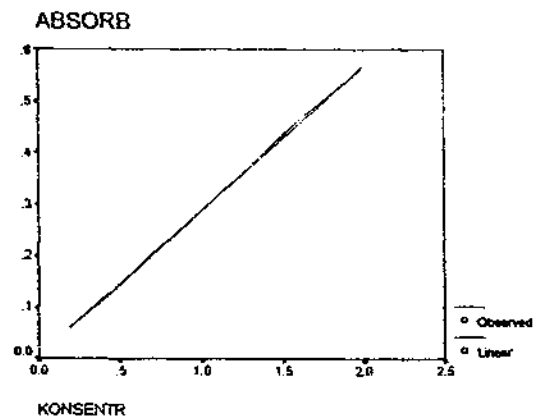
Dependent Mth	Rsq	d.f.	F	Sigf	b0	b1
ABSORBSI LIN	.9493	56.01	.005		.9532	-.0495



2. Kurva baku MDA

Independent: KONSENTR

Dependent Mth	Rsq	d.f.	F	Sigf	b0	b1
ABSORB LIN	.9993	5359.99	.000		.0042	.2814



Hasil Pemeriksaan Kadar MDA plasma , Aktivitas SOD eritrosit dan PCV

Sampel	MDA (ug/mm ³)	SOD (uU/eri)	PCV (%)
01	0.4354	0.1181	44
02	0.6111	0.1142	46
03	0.4127	0.1017	43
04	0.4807	0.8300	37
05	0.7634	0.0980	40
11	1.1837	0.0622	39
12	1.1610	0.0730	41.5
13	0.8345	0.0599	43
14	1.4104	0.0495	46.5
15	0.6077	0.0467	45
16	1.1451	0.0490	43
21	1.2834	0.0618	42.5
22	1.0603	0.0820	39
23	0.6712	0.0524	40
24	0.8300	0.0600	43
25	0.9875	0.0720	45
26	0.6213	0.0552	45
31	0.6780	0.0952	44
32	0.8073	0.0815	40.5
33	0.6812	0.0700	39.5
34	0.6834	0.0560	45
35	0.8834	0.0690	44.5
41	0.4807	0.0903	42
42	0.4376	0.0962	46
43	0.3923	0.1025	43
44	0.7438	0.1130	40
45	0.3039	0.0760	44

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
MDA	27	,757951	,2968298	,3039	1,4104

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		MDA
N		27
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,757951
	Std. Deviation	,2968298
Most Extreme Differences	Absolute	,155
	Positive	,155
	Negative	-,089
Kolmogorov-Smirnov Z		,804
Asymp. Sig. (2-tailed)		,538

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

IPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
SOD	27	,077341	,0216595	,0467	,1181

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		SOD
N		27
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,077341
	Std. Deviation	,0216595
Most Extreme Differences	Absolute	,131
	Positive	,131
	Negative	-,091
Kolmogorov-Smirnov Z		,681
Asymp. Sig. (2-tailed)		,743

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean	
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error
MDA	27	1.1065	.3039	1.4104	.757951	5.712E-02
Valid N (listwise)	27					

Descriptive Statistics

	Std. Deviation	Variance	Skewness		Kurtosis	
	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error
MDA	.296830	8.811E-02	.572	.448	-.509	.872
Valid N (listwise)						

Descriptives

Descriptive Statistics

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean	
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error
SOD	27	.0714	.0467	.1181	7.734E-02	4.168E-03
Valid N (listwise)	27					

Descriptive Statistics

	Std. Deviation	Variance	Skewness		Kurtosis	
	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error
SOD	2.166E-02	4.691E-04	.364	.448	-1.028	.872
Valid N (listwise)						

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
MDA	2.337	4	22	.087
SOD	.179	4	22	.947

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
MDA	Between Groups	1.378	4	.344	8.301	.000
	Within Groups	.913	22	.041		
	Total	2.291	26			
SOD	Between Groups	.009	4	.002	13.402	.000
	Within Groups	.004	22	.000		
	Total	.012	26			

Post Hoc Tests

Descriptives

83

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
						Lower Bound	Upper Bound
MDA	0	5	,515460	,1027057	,0459314	,387934	,642986
	1	6	1,057012	,2866410	,1170207	,756200	1,357823
	2	6	,908950	,2509145	,1024354	,645631	1,172269
	3	5	,746660	,0940426	,0420571	,629891	,863429
	4	5	,471660	,1656377	,0740754	,265994	,677326
	Total	27	,757951	,2968298	,0571249	,640529	,875373
SOD	0	5	,103000	,0139655	,0062456	,085660	,120340
	1	6	,056683	,0101504	,0041439	,046031	,067335
	2	6	,063900	,0111425	,0045489	,052207	,075593
	3	5	,074340	,0147488	,0065959	,056027	,092653
	4	5	,095600	,0138110	,0061765	,078451	,112749
	Total	27	,077341	,0216595	,0041684	,068773	,085909

		Minimum	Maximum
MDA	0	,4127	,6374
	1	,6077	1,4104
	2	,6213	1,2834
	3	,6780	,8834
	4	,3039	,7438
	Total	,3039	1,4104
SOD	0	,0830	,1181
	1	,0467	,0730
	2	,0524	,0820
	3	,0560	,0952
	4	,0760	,1130
	Total	,0467	,1181

Between-Subjects Factors

	N
PLK 0	5
1	6
2	6
3	5
4	5

Multivariate Tests^c

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.981	529.408 ^a	2.000	21.000	.000
	Wilks' Lambda	.019	529.408 ^a	2.000	21.000	.000
	Hotelling's Trace	50.420	529.408 ^a	2.000	21.000	.000
	Roy's Largest Root	50.420	529.408 ^a	2.000	21.000	.000
PLK	Pillai's Trace	.886	4.377	8.000	44.000	.001
	Wilks' Lambda	.144	8.586 ^a	8.000	42.000	.000
	Hotelling's Trace	5.735	14.337	8.000	40.000	.000
	Roy's Largest Root	5.698	31.338 ^b	4.000	22.000	.000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept+PLK

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	MDA	1.378 ^a	4	.344	8.301	.000
	SOD	8.648E-03 ^b	4	2.162E-03	13.402	.000
Intercept	MDA	14.666	1	14.666	353.424	.000
	SOD	.166	1	.166	1028.493	.000
PLK	MDA	1.378	4	.344	8.301	.000
	SOD	8.648E-03	4	2.162E-03	13.402	.000
Error	MDA	.913	22	4.150E-02		
	SOD	3.549E-03	22	1.613E-04		
Total	MDA	17.802	27			
	SOD	.174	27			
Corrected Total	MDA	2.291	26			
	SOD	1.220E-02	26			

a. R Squared = .601 (Adjusted R Squared = .529)

b. R Squared = .709 (Adjusted R Squared = .656)

Post Hoc Tests

PLK

Dependent Variable	(I) PLK	(J) PLK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
MDA	0	1	-.541552*	.1233504	.000	-.797365	-.285739
		2	-.393490*	.1233504	.004	-.649303	-.137677
		3	-.231200	.1288353	.086	-.498388	.035988
		4	.043800	.1288353	.737	-.223388	.310988
	1	0	.541552*	.1233504	.000	.285739	.797365
		2	.148062	.1176100	.221	-.095846	.391970
		3	.310352*	.1233504	.020	.054539	.566165
		4	.585352*	.1233504	.000	.329539	.841165
	2	0	-.393490*	.1233504	.004	-.649303	-.137677
		1	-.148062	.1176100	.221	-.391970	.095846
		3	.162290	.1233504	.202	-.093523	.418103
		4	.437290*	.1233504	.002	.181477	.693103
	3	0	.231200	.1288353	.086	-.035988	.498388
		1	-.310352*	.1233504	.020	-.566165	-.054539
		2	-.162290	.1233504	.202	-.418103	.093523
		4	.275000*	.1288353	.044	.007812	.542188
	4	0	-.043800	.1288353	.737	-.310988	.223388
		1	-.585352*	.1233504	.000	-.841165	-.329539
		2	-.437290*	.1233504	.002	-.693103	-.181477
		3	-.275000*	.1288353	.044	-.542188	-.007812
SOD	0	1	.046317*	.0076911	.000	.030366	.062267
		2	.039100*	.0076911	.000	.023150	.055050
		3	.028660*	.0080331	.002	.012000	.045320
		4	.007400	.0080331	.367	-.009260	.024060
	1	0	-.046317*	.0076911	.000	-.062267	-.030366
		2	-.007217	.0073332	.336	-.022425	.007991
		3	-.017657*	.0076911	.032	-.033607	-.001706
		4	-.038917*	.0076911	.000	-.054867	-.022966
	2	0	-.039100*	.0076911	.000	-.055050	-.023150
		1	.007217	.0073332	.336	-.007991	.022425
		3	-.010440	.0076911	.188	-.026390	.005510
		4	-.031700*	.0076911	.000	-.047650	-.015750
	3	0	-.028660*	.0080331	.002	-.045320	-.012000
		1	.017657*	.0076911	.032	.001706	.033607
		2	.010440	.0076911	.188	-.005510	.026390
		4	-.021260*	.0080331	.015	-.037920	-.004600
	4	0	-.007400	.0080331	.367	-.024060	.009260
		1	.038917*	.0076911	.000	.022966	.054867
		2	.031700*	.0076911	.000	.015750	.047650
		3	.021260*	.0080331	.015	.004600	.037920

*. The mean difference is significant at the .05 level.



Foto 1. Latihan Olahraga Anaerobik



Foto 2 Pengambilan Darah

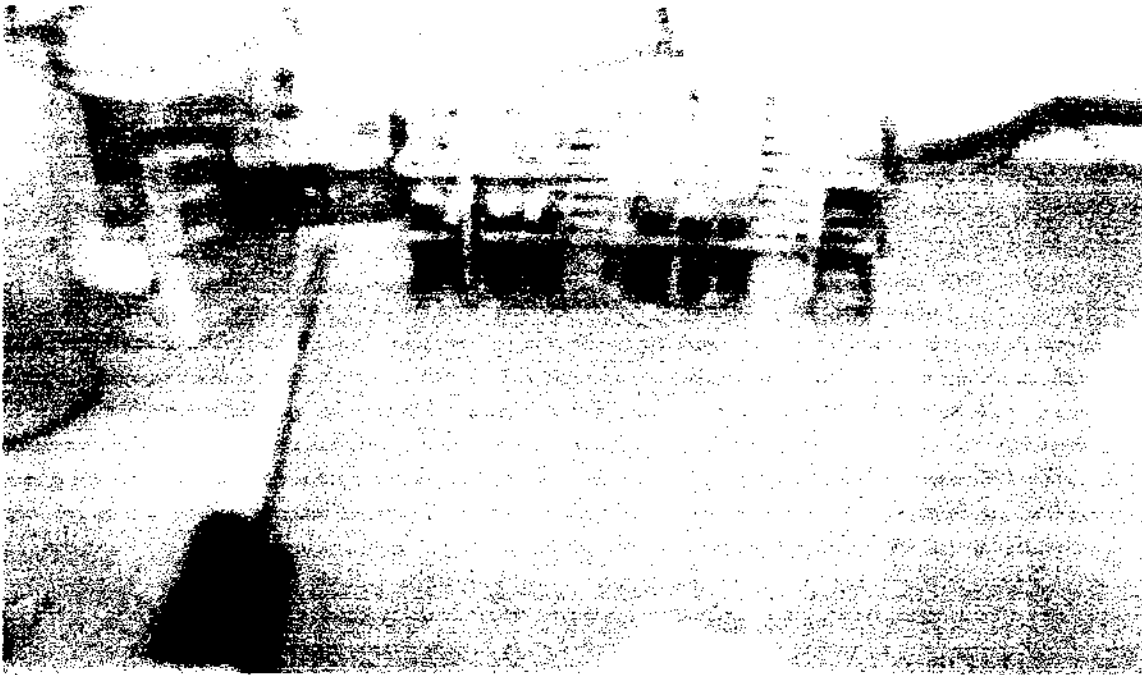


Foto 3. Hasil Pemeriksaan SOD

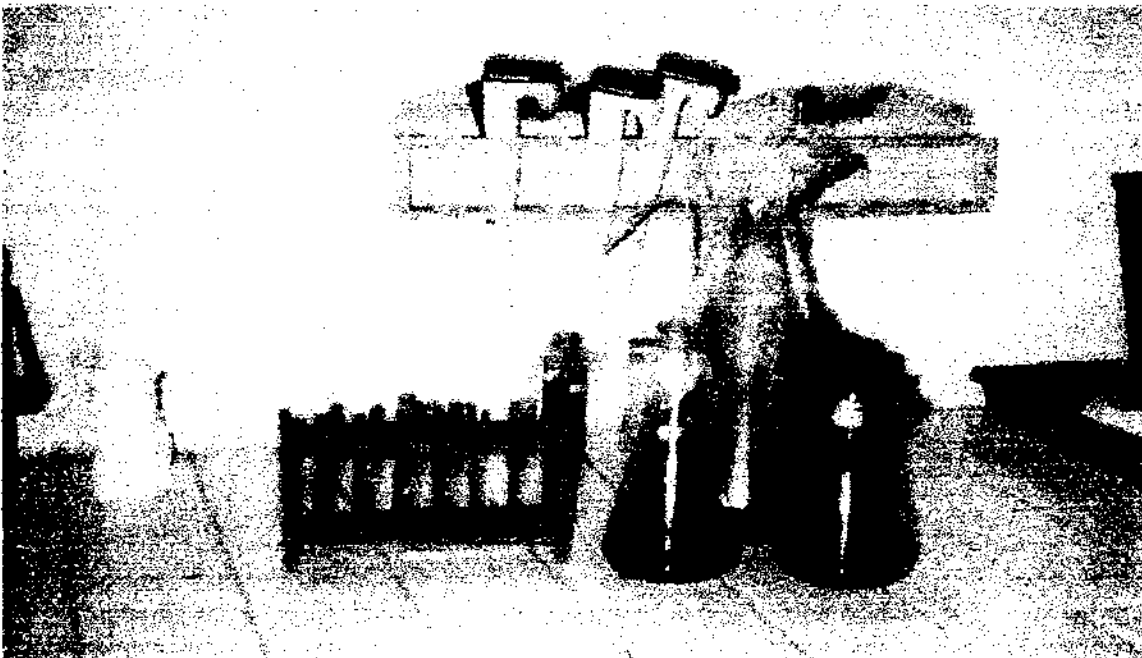


Foto 4. Proses Mengekstraksi Jinten Hitam

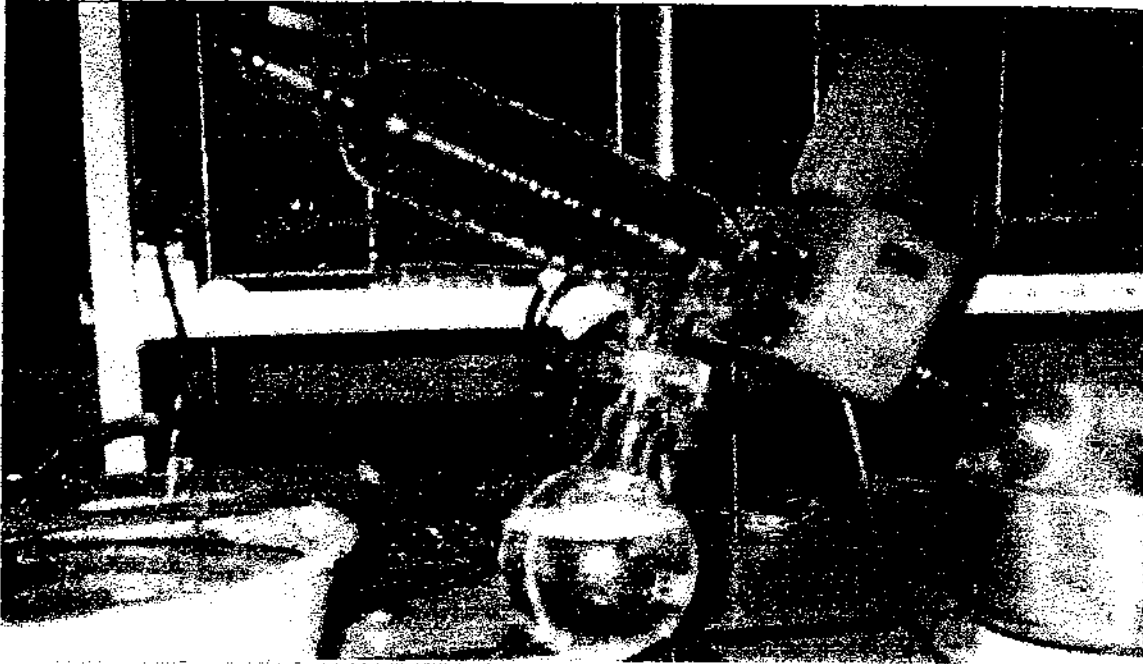


Foto 5. Evaporator



Foto 6. Pemeriksaan dengan Spektrofotometer